

# **ZUM MUSKELSTOFFWECHSEL**

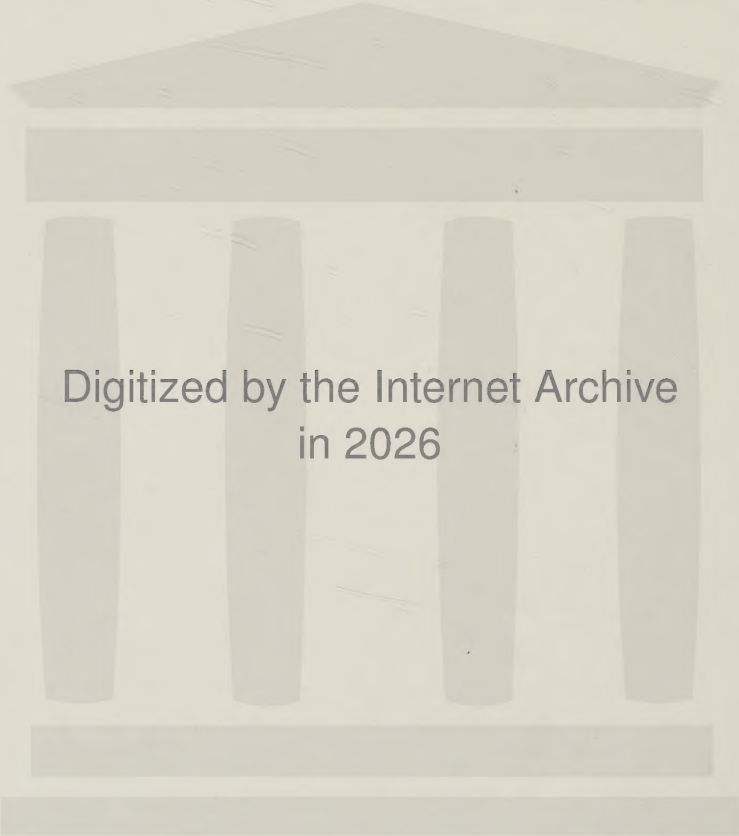
**In vitro Untersuchungen über die Wirkung von  
Milchsäure, Biguaniden und Insulin  
auf den Stoffwechsel des Rattenzwerchfells**

Paul Wagner

1974







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41551924\\_0041](https://archive.org/details/IA41551924_0041)

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität  
München

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

---

## ZUM MUSKELSTOFFWECHSEL

In vitro Untersuchungen über die Wirkung von  
Milchsäure, Biguaniden und Insulin auf den  
Stoffwechsel des Rattenzwerchfells.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt  
von  
Paul Wagner aus  
Weilheim

München 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. P. Dieterle  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn  
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.4.1974



Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Priv.Doz. Dr. P. Dieterle. Besonderer Dank gilt ihm für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten, die Einführung in die wissenschaftliche Tätigkeit und die Bereitschaft, mir fast täglich mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Mein Dank gilt auch Herrn J. Henner und Frl. H. Vaitl, die mich im Labor freundlich und hilfsbereit unterstützten.

Weiterhin danke ich Frl. Haag für die freundliche Hilfe beim Anfertigen der Zeichnungen.



## Einleitung

Aus der Therapie des Diabetes mellitus ist bekannt, daß Biguanide nur in Anwesenheit von Insulin wirksam sind. Beim Insulinmangeldiabetiker wirken sie allein nicht. Weiterhin ist aus der Klinik des Diabetes mellitus bekannt, daß Muskelarbeit die Stoffwechsellage des Diabetikers wesentlich verbessert, sei es, daß sie beim Insulinmangeldiabetiker die Insulindosis zu verrindern hilft, oder daß sie beim Altersdiabetiker oder Übergewichtigem Diabetiker zusammen mit einer Diät eine weitere Therapie überflüssig machen kann. Als entscheidendes Stoffwechselprodukt der Muskelarbeit ist Lactat anzusehen.

Unsere Untersuchungen zielten darauf ab, eine gemeinsame Wirkung von Lactat und Insulin zu beobachten. Zudem war uns aus der Literatur bekannt, daß unter Biguaniden die Lactatproduktion ansteigt. Deshalb vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen der Biguanidwirkung und der Lactatwirkung. Es sollen auch Versuche durchgeführt werden, die Stoffwechselwirkungen in Anwesenheit von Insulin, Buformin und Lactat zeigen sollten.

In ergänzenden Versuchen sollen Wirkungen gezeigt werden, die durch Biguanide und Lactat in Anwesenheit von Insulin bedingt sind.

## Meßmethoden

### 1. Bestimmung von Glucose und Lactat.

#### a) Aufbereitung der Proben.

3 ml 4 %ige Perchlorsäure wurden in ein 10 ml Rundzentrifugenglas pipettiert. Dazu kam 1 ml des zu untersuchenden Mediums. Bei Verwendung von Vollblut ist es angezeigt, die Gläser vor und nach Zugabe des Vollblutes zu wiegen, da beim Pipettieren von Vollblut eine größere Fehlermöglichkeit besteht als bei Serum oder Puffermedium, wie es hier verwendet wurde. Anschließend wurden die Gläser 5 min. bei ca. 3000 U/min. zentrifugiert, der Überstand in ein 10 ml Rundzentrifugenglas umgegossen und die Gläser dann in ein Eisbad gestellt. Mit 5 n KOH wurden die Proben auf ca. pH 5 gebracht und durch Zugabe von Bikarbonat auf pH 7, was durch pH-Papier kontrolliert wurde. Danach wurden die Proben nochmals 5 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert, der Überstand wieder abgegossen und ins Eisbad gestellt. Die Proben sind jetzt für die Messungen gebrauchsfertig.

#### b) Glucose-Bestimmung

Vor Versuchsbeginn wurden bereits die einzelnen Lösungen hergestellt. Lösung Nr. 1 (Tram-Puffer) wurde folgendermaßen hergestellt:

18,6 g Triäthanolamin Hydrochlorid (Puffersubstanz TRA 15325 HTAA, 250 g, Fa. BOEHRINGER u. Söhne) auf ca. 450 ml Aqua bidest., dazu 406,6 mg Magnesiumchlorid  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$  (MERCK 5833). Mit 5 n KOH auf pH 7,5 einstellen mittels pH-Papier, danach mit Aqua bidest. die Lösung auf 500 ml auffüllen. Der Tram-Puffer ist bei 4°C ca. 1 Monat haltbar.

Lösung Nr. 2 (Glucose-Puffer) wurde folgendermaßen hergestellt:

40 ml Tram-Puffer (Lösung Nr. 1)

24,2 mg ATP (BOEHRINGER 15028 NAAH)

30 mg NADP (BOEHRINGER 15600 CNAF)

Der Glucose-Puffer ist bei 4°C ca. 1 Woche haltbar.

Arbeitsgang:

1. 0,5 ml Lösung Nr.2 in Halb-Microküvetten pipettieren.
2. 0,05 ml aufbereitete Probe in die Küvette pipettieren, bei Leerwert Aqua bidest., anschließend mit Kunststoff-Rührkrücke gut mischen.

3. Im Photometer mit Filter 334 nm in temperiertem Küvettenhalter bei 25°C gegen Leerwert messen, mit Schreibgerät abwarten, bis sich Reaktion einstellt und  $E_1$  ablesen.

4. 0,005 ml Lösung Nr. 4 aus BOEHRINGER Glucose-Hexokinase Testpackung dazupipettieren.

5. Ablesen von  $E_2$ , wenn Reaktion abgelaufen ist.

Alle Bestimmungen wurden mit Doppelwerten ausgeführt.

Das Prinzip der Hexokinase-Reaktion beruht darauf, daß Glucose in Anwesenheit von ATP unter Wirkung der HK in 6-Stellung phosphoryliert wird. Es entsteht G-6-P, das mittels G-6-PDH in 1-Stellung oxydiert wird. Der bei dieser Reaktion freiwerdende Wasserstoff wird auf NADP übertragen; es entsteht NADPH. Der Zuwachs an NADPH wird photometrisch gemessen. Die Reaktion verläuft stöchiometrisch, da pro Mol oxydierter Glucose ein Mol NADPH entsteht. Somit ist die Extinktionsänderung auf Grund der Zunahme an NADPH gleichzusetzen der Menge an oxydierter Glucose.

Die Reaktion ist streng spezifisch. Störend eingehen könnte Fructose. Im Blut kommt aber Fructose nur in ganz geringen Mengen vor. Außerdem muß Fructose, damit sie reagieren kann, vorher in Glucose übergeführt werden. Dazu ist das Enzym FI nötig. Da wir nur hochgereinigte Enzyme der Fa. BOEHRINGER verwendeten, konnten wir sicher sein, daß FI nicht vorhanden ist und daß wir nur Glucose gemessen hatten.

Die Berechnung erfolgte nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz:

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon$$

Nach  $c$  aufgelöst ergibt sich

$$c = \frac{E}{d \cdot \epsilon}$$

Da aber noch die Verdünnung bei der Enteiweißung, Titration mit KOH und die Verdünnung der Proben mit dem Puffer berücksichtigt werden muß, lautet die obige Formel:

$$c = E \frac{\text{Gesamtvolumen} \times \text{Verdünnung}}{\text{Testvolumen} \times d \times \epsilon}$$

Dabei bedeuten:

Gesamtvolumen das Volumen, das sich insgesamt in der Küvette befindet, d.h. 0,5 ml Puffer, 0,05 ml Probe und 0,005 ml Enzymlösung. Das ergibt als Wert für das Gesamtvolumen 0,555 ml. Verdünnung diejenige Menge an Perchlorsäure (3 ml) und KOH (ca. 0,15 bis 0,4 ml, bei der stets gleichbleibenden Zusam-

mensetzung des Inkubationsmediums brauchten die Proben immer nur mit derselben Menge -0,225 ml- KOH tritriert werden), dazu kommt noch 1 ml Probe. Insgesamt beträgt also der Faktor verdünnung 4 + Menge KOH, in diesen Versuchen 4,225. Testvolumen ist das Volumen an Probe, welches in die Küvette pipettiert wird, also 0,05 ml.

d ist die Schichtdicke der Küvette, die mit 1 cm immer konstant blieb.

$\epsilon$  ist der Extinktionskoeffizient, der von der Temperatur (immer 25 °C) und von der wellenlänge des Filters (immer 334 nm) abhängt. Der Wert beträgt 6,09.

Da bei der obigen Formel das Ergebnis in der Dimension  $\mu\text{mol/ml}$  erscheint, muß noch ein Faktor eingeführt werden, der das Ergebnis auf die Dimension mg% umformt, und zwar

$$\frac{\text{Molekulargewicht} \times 100}{1000}$$

Nach Einführung all dieser Werte in die Formel

$$c = E \times \frac{\text{Gesamtvolumen} \times \text{verdünnung} \times \text{mol.gew.} \times 100}{\text{Testvolumen} \times d \times \epsilon \times 1000}$$

ergibt sich

$$c = E \times 32,8079 \times \text{Verdünnung (KOH)}.$$

Der Ausdruck Verdünnung (KOH), mit dem die Menge KOH gemeint ist, mit der die Proben auf pH 5 gebracht wurden, wurde absichtlich offen gelassen, da bei Bestimmungen im Vollblut oder Serum diese Menge unterschiedlich ist. Wir haben uns für unser Labor eine Tabelle angefertigt, aus der der für jede eingesetzte Menge KOH entsprechende verdünnungsfaktor zu entnehmen ist. Für die bei diesen Versuchen fast immer gleiche Menge von 0,225 ml KOH lautet die obige Formel also

$$c = E \times 138,6134 \quad (\text{mg\% Glucose}).$$

In Vorversuchen wurde in 10er Bestimmungen die Genauigkeit dieser Meßmethode überprüft. Wir erhielten dabei eine Standardabweichung von 6 mg% und einen variationskoeffizienten von 1,393 %. Diese Kontrollwerte ließen sich noch verbessern, wenn man bei hoch zu erwartenden Glucosekonzentrationen nicht 0,05 ml Probe, sondern entsprechend weniger einsetzt, z.B. 0,02 ml, was wir z.T. durchführten. Die Verdünnungsfaktoren müssen dann entsprechend umgerechnet werden.

### c) Lactatbestimmung

Auch hier wurden vor Versuchsbeginn die Lösungen hergestellt.

Lactat-Stammlösung Nr. 10 besteht aus:

150 g Glykokoll (MERCK 4201)

4 g Titriplex III (MERCK 8418)

104 g Hydraziniumsulfat (MERCK 4603)

in 1000 ml Aqua bidest. lösen. Gemisch gut durchschütteln, da die die Lösung nah am Sättigungsgrad liegt.

Lactat-Puffer Lösung Nr.11:

15 ml Lactat-Stammlösung Nr. 10 und

15 ml 2 n NaOH zusammengeben; das ergibt einen pH von 9,5.

Mit pH-Papier nachmessen!

27 ml von dem Gemisch mit pH 9,5 und

24 ml Aqua bidest. ergibt Lactat-Puffer.

NAD-Lösung Nr. 8:

265 mg NAD (BOEHRINGER 15300 CNA) auf 4 ml Aqua bidest.

Arbeitsgang:

1. 1,7 ml Lactat-Puffer Lösung Nr.11 in Küvetten pipettieren.

2. 0,05 ml NAD-Lösung Nr. 8 dazupipettieren.

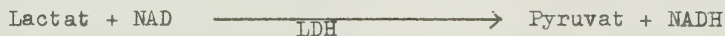
3. 0,05 ml aufbereitete Probe in Küvette pipettieren, mit Rührkrücke gut durchmischen. Bei Leewert Aqua bidest. einpipettieren.

4. Im Photometer mit Filter 334 nm in temperiertem küvettenhalter (25°C) gegen Leewert messen. Mittels Schreibgerät abwarten, bis sich Reaktion eingestellt hat. Man erhält  $E_1$ .

5. 0,01 ml LDH (BOEHRINGER 15371 ELAC) in Küvette einpipettieren und gut durchmischen.

6. Messen von  $E_2$ , wenn Reaktion abgelaufen ist.

Die Lactatbestimmung beruht auf folgendem Prinzip:



Mit dem Ablauf dieser Reaktion erhält man eine Zunahme an NADH. Da pro Mol Lactat ein Mol NADH entsteht, kann man aus der Zunahme von NADH die Konzentration des freien Lactats berechnen. Die Berechnung erfolgt ebenso wie die der Glucose. Hier ist das Gesamtvolumen 1,81 ml, das Testvolumen 0,05 ml, das Molekulargewicht von Lactat beträgt 90.

Die Umrechnungsformel lautet also:

$$c = E \times 53,545 \times \text{verdünnung (KOH)}.$$

Bei einer verdünnung mit  $\Delta\text{OH}$  von 0,225 ml lautet die Formel:

$$c = E \times 222,2276$$

Bei Vorversuchen erzielten wir in Zehnerbestimmungen eine standardabweichung von 4,6 mg% und einen variationskoeffizienten von 4,7 %.

## 2. Bestimmung der nicht veresterten Fettsäuren (NFS).

Die Methode erfolgte nach der von DUNCOMBE angegebenen Methode (13). Bei dieser Methode werden die NFS als Kupfersalze mit Chloroform extrahiert. Die Kupfersalze werden mit Diäthylthiocarbaminat in einen Kupferkomplex überführt und kolorimetrisch bestimmt.

Reagenzien:

1. Chloroform p.a.

2. Kupfereagenz:

a)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ; 6,45 %ige Lösung

b) 9 Teile 1-molares Triäthanolamin + 1 Teil 1 n Essigsäure.

a) und b) werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

3. Natrium-Diäthylthiocarbaminat ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NNA}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ).

Davon wird eine 0,1 %ige Lösung in sekundärem Butanol hergestellt.

Lösung 2 und 3 müssen im Kühlschrank bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt und jede Woche erneuert werden.

Durchführung:

Man pipettiert nacheinander in ein Schliffreagenzglas 5 ml Chloroform (bzw. 5 ml gelösten Palmitinsäurestandard) und 2,5 ml Kupfereagenz. Dazu gibt man 0,5 ml Probe. Das Glas wird mit einem Kunststoffstopfen verschlossen und in einer dreidimensionalen rotierenden Schüttelmaschine geschüttelt, und zwar 30 Minuten lang, um eine volle Ausbeute zu erhalten. Anschließend wird das Gemisch 10 Minuten lang mit 3000 U/min. zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, die durch eine Eiweißschicht voneinander getrennt sind. Bei der oberhalb der Eiweißschicht befindlichen Phase handelt es sich um die wässrige Kupferphase. Diese muß man vorsichtig absaugen. wir verwendeten dazu eine fein ausgezogene Polyäthylenkanüle, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist. Wenn die Glaswand sorgfältigst von Kupferspuren gereinigt ist, muß die Ei-

weißschicht vorsichtig abgesaugt werden. Dabei muß man darauf achten, daß man keine Kupferspuren in die unten befindliche Phase bringt. Diese untere Phase ist das Perchlorsäure-Chloroformgemisch.

Von diesem Gemisch werden 3 ml abpipettiert; dazu gibt man 0,5 ml Diäthylthiocarbaminat. Man schüttelt kurz mit der Hand und mißt sofort den entstandenen Kupferkomplex in einem Farbkolorimeter. Gemessen wird gegen einen durch die ganze Bestimmung mitlaufenden Leerwert, der kein Serum enthält. Als Standard verwendeten wir einen Palmitinsäurestandard, der eine genau definierte Menge Palmitinsäure enthielt. Dieser Standard läuft ebenfalls während der ganzen Bestimmung mit.

Die Berechnung ergibt sich dann als einfacher Dreisatz:

$$\text{Extinktion}_{(\text{Probe})} \times \frac{\mu\text{val/L}_{(\text{Standard})}}{\text{Extinktion}_{(\text{Standard})}} \times 10 = \mu\text{val/l NFS.}$$

Der Faktor 10 ergibt sich daraus, daß man eine 10-fache Menge des Standards mit der eingesetzten Serummenge vergleicht. Man verwendet für den Standard nicht 0,5 ml, wie bei der Serumprobe, sondern 5 ml.

Man erfaßt mit dieser Methode nur die Höhermolekularen NFS; dagegen werden die kurzkettigen NFS nicht mitbestimmt. Da physiologisch nur die langkettigen eine Rolle spielen, besteht keine Gefahr, daß man fälschlicherweise zu hohe Werte bestimmt. In Vorversuchen wurde der VK zu 2,7 % ermittelt. Demnach beträgt die meßtechnische Schwankung bei einem Ausgangswert von 400  $\mu\text{val/l}$  nur 10,8  $\mu\text{val/l}$ .

### 3. Bestimmung des Glycerins.

Die Glycerinbestimmung wurde enzymatisch nach den Angaben von KREUTZ (16) durchgeführt.

Benötigte Reagenzien:

#### 1. Zusammensetzung des Puffers

- a) Triäthanolamin-Hydrochlorid 0,3 molar.
- b)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,06 molar
- c)  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  0,3 molar

Wird diese Zusammensetzung gewählt, ergibt sich der pH-Wert von selbst zu 7,5.

#### 2. Enzymlösung I

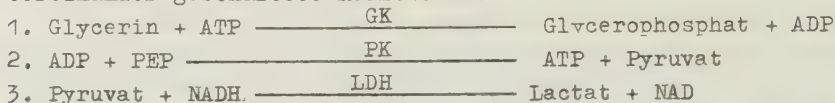
Gemisch aus NADH, PEP, ATP; gelöst werden diese in 5%  $\text{NaHCO}_3$

### 3. Enzymlösung II

Gemisch aus PK und LDH

### 4. Glycerokinase

Bei der enzymatischen Bestimmung handelt es sich um drei hintereinander geschaltete Reaktionen:



Wie ersichtlich, geht Glycerophosphat nicht weiter in die Reaktion ein, so daß es, auch wenn es im Inkubationsmedium vorhanden sein sollte, die Ergebnisse nicht verfälschen kann. Im Inkubationsmedium befindliches Pyruvat stört dagegen die Reaktion empfindlich. Man muß daher erst die Pyruvatreaktion ablaufen lassen, bevor man mit der eigentlichen Messung beginnt. Diese Pyruvatreaktion verläuft als Schleichreaktion. Wir kontrollierten sie mit einem an das Photometer gekoppelten Schreiber. Erst wenn die Schleichreaktion abgelaufen war, begannen wir mit der Messung des Glycerins.

Durchführung:

Wir pipettierten zu 2,3 ml Puffer in der Küvette 0,5 ml Inkubationsmedium. Es wurden 0,2 ml der Enzymlösung I zugegeben, danach 0,03 ml der Enzymlösung II. Mit Kunststoffkrücken wurde gut durchgemischt. Nachdem der Leerschleichen abgelaufen war (siehe oben), wurde bei konstanter Temperatur von 25°C die Extinktion  $E_1$  gemessen. Zum Starten der Reaktion wurde GK zugegeben. Es wurde erneut durchgemischt. In spätestens 5 Minuten war die Reaktion zu Ende gelaufen. Es konnte dann  $E_2$  gemessen werden. Aus der Extinktionsdifferenz  $E_2 - E_1$  läßt sich die Abnahme an NADH berechnen. Da alle drei hintereinandergeschalteten Reaktionen (siehe oben) Mol pro Mol verlaufen, entspricht die Abnahme des NADH der Glycerinkonzentration.

Die Berechnung wurde nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz durchgeführt.

Für die von uns gewählten Bedingungen ergibt sich damit folgende Beziehung:

$$\mu\text{mol/ml (Glycerin)} = (E_2 - E_1) \times \frac{TV}{\epsilon \times d \times GV}$$

TV bedeutet Testvolumen = 0,5 ml.

GV bedeutet Gesamtvolumen = 3,03 ml

$$\mu\text{mol/l (Glycerin)} = (E_2 - E_1) \times 1,0016$$

#### 4. Bestimmung des Glykogens

Das Glykogen wurde nach der von KEMP angegebenen Methode (28) bestimmt.

Reagenzien:

##### 1. Lösung Nr. 1:

100 mg  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  (MERCK 1534) wurden in 100 ml 5 %iger Trichloressigsäure (5 g kristallisierte Trichloressigsäure, MERCK 810, auf 100 ml Aqua bidest.) gelöst. Diese Lösung muß kurz vor der Bestimmung zubereitet werden und vor Lichteinfluß geschützt werden.

##### 2. 95 - 97 %ige Schwefelsäure

##### 3. 80 %iges Methanol.

Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Gewebsauflösung in Trichloressigsäure mit Zusatz von Silbersalz und einer anschließenden kolorimetrischen Bestimmung des durch Säure gespaltenen Glykogens. Die dabei entstehende Glucose wird an die Schwefelsäure gekoppelt und ist so kolorimetrisch meßbar.

Durchführung:

Nach Entnahme der Muskelstücke aus dem Inkubationsmedium wurden sie zuerst in 80 %igem Methanol gespült, um etwa vorhandene freie Glucose wegzuspülen. Anschließend wurden die Stücke in ein Reagenzglas gegeben, in das zuvor 5 ml der Lösung Nr. 1 gegeben worden waren und das gewogen war. Nach Zugabe der Muskelstücke wurde wiederum gewogen. Dann wurden die Gläser 15 min. in ein siedendes Wasserbad gestellt. Danach war das Gewebe gut aufgelöst. Die Gläser kamen zum Abkühlen in ein Eisbad und wurden dann 15 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein Reagenzglas pipettiert und 3 ml Schwefelsäure (vorsichtig!) dazupipettiert. Mit einem Glasstab wurde solange umgerührt, bis die Schlieren verschwunden waren. Danach wurden die Proben noch einmal 6,5 min. in ein siedendes Wasserbad gestellt, anschließend im Eisbad abgekühlt. Die an die Schwefelsäure gebundene Glucose mißt man kolorimetrisch im Photometer bei 546 nm gegen Aqua bidest. als Leewert.

Berechnung:

Die Konzentration an Glykogen pro 100 mg Gewebe ergibt sich aus der Formel

$$c = \frac{\text{Extinktion der Probe} - \text{Leewert}}{\text{Gewicht des Muskels in mg}} \times 80,4$$

Der Faktor 80,4 ergibt sich aus der Verdünnung durch die Schwefelsäure und die Trichloressigsäure, die Schichtdicke der Küvette, dem Extinktionskoeffizienten und dem Molekulargewicht der Glucose.

In Vorversuchen ergab sich in Verdünnungsreihen und Zehnerbestimmungen von Glykogenlösungen eine gute Reproduzierbarkeit. Bei Bestimmungen des Glykogengehalts von Zwerchfellen, die in drei Teile geteilt waren und getrennt bestimmt wurden, ergab sich eine Genauigkeit bis auf die dritte Stelle hinter dem Komma.

## Versuchsanordnung

### 1. Zubereitung des Inkubationsmediums

Als Inkubationsmedium verwendeten wir Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer (53) mit folgender Zusammensetzung:

|        |           |                                         |
|--------|-----------|-----------------------------------------|
| 8 ml   | 1,15 %ige | KCl-Lösung                              |
| 6 ml   | 1,63 %ige | CaCl <sub>2</sub> -Lösung               |
| 2 ml   | 3,82 %ige | MgSO <sub>4</sub> -Lösung               |
| 2 ml   | 2,11 %ige | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung |
| 200 ml | 0,9 %ige  | NaCl-Lösung                             |
| 21 ml  | 1,3 %ige  | NaHCO <sub>3</sub> -Lösung              |

---

#### 260 ml KRB-Puffer

Von diesen 260 ml wurden 160 ml zur Vorinkubation verwendet. In den verbleibenden 100 ml wurden 3 Gramm Serum-Albumin vom Rind, trocken, "reinst" (BEHRINGWERKE) gelöst. Zusätzlich wurden noch 200 mg wasserfreie, sterile Glucose zugegeben, sodaß eine Glucosekonzentration von 200 mg% erreicht wurde. Dieser Ansatz wurde dann in drei Teile geteilt:

- a) Der erste bekam keinen weiteren Zusatz und diente für alle Ansätze ohne Lactat.
- b) Zu 45 ml wurden 0,225 ml einer 5 %igen Milchsäure gegeben. Diese Lösung diente für alle Ansätze mit 25 mg% Lactat.
- c) Zu weiteren 45 ml wurden 0,45 ml der 5 %igen Milchsäure pipettiert. Diese Lösung diente für die Ansätze mit 50 mg% Lactat.

Diese drei Lösungen wurden dann mit NaOH mittels pH-Meter auf pH 7,4 (genau) gebracht.

Von diesen drei Lösungen wurden 5 ml Inkubationsmedium entnommen und in ein WARBURG-Gefäß pipettiert.

Zu Buformin-Ansätzen wurden noch 0,02 ml einer 4 %igen Buforminlösung gegeben (Fa. GRÜNENTHAL), die vorher im Verhältnis 1 : 160 mit Aqua bidest. verdünnt worden war. Das entsprach einer Konzentration von 1 µg/ml. Zu Insulin-Ansätzen wurden 0,04 ml einer Insulin-Lösung gegeben, die folgendermaßen hergestellt worden war: 1,85 mg Glucagonfreies Insulin wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst. 1,85 mg Insulin entsprachen 1 Einheit. In 0,01 ml der Lösung befanden sich dann 500 µE und in 0,04 ml 2000 µE. Im Inkubationsmedium befand sich dann eine

Konzentration von 400  $\mu$ E/ml.

Ansätze mit Buformin und Insulin erhielten 0,02 ml der Buforminlösung und 0,04 ml der Insulinlösung.

## 2. Behandlung und Präparation der Versuchstiere

Verwendet wurden nur männliche Ratten des Stammes Wistar II (Fa. BRÜNGER, Bokel bei Bielefeld) mit einem Gewicht zwischen 140 und 250 Gramm. Die Tiere wurden mindestens zwei Tage nach der Lieferung durch die Züchterei ad libitum bei Futter gehalten. Vor Verwendung achteten wir darauf, daß sich die Tiere einigermaßen ruhig verhielten. Wir hielten sie dazu ca. 1 Stunde in einem Käfig, der mit Zellstoff abgedeckt war. Nach erfolgter Dekapitation wurde binnen einer Minute das Zwerchfell herauspräpariert. Bei der Präparation wurde sorgfältig darauf geachtet, daß nur Muskelgewebe entfernt wurde. Zuerst trennten wir in einem Rundschnitt die Sehnenplatte vom übrigen Zwerchfell und anschließend schnitten wir dieses aus dem Situs. Die Zwerchfelle wurden in zwei Hälften geteilt. Die eine diente zur Bestimmung des Glykogens vor der Inkubation, die andere zur Inkubation. Vor dieser inkubierten wir die Zwerchfelle in glucosefreiem KRB-Puffer. Dadurch sollten zelleigene Energiesubstrate möglichst verbraucht werden, damit die Substrataufnahme aus dem Puffermedium dann größer und deutlicher wird. Zur Gewichtsbestimmung der Muskelstücke wurden die WARBURG-Gefäße vor und nach dem Einlegen der Muskelstücke gewogen. Vor der Inkubation wurden die Gefäße mit Carbogen begast, und zwar 30 Sekunden, und sofort verschlossen.

## 3. Inkubation

Die Gefäße wurden dann zwei Stunden bei 37°C in einem WARBURG-Apparat inkubiert, der einerseits die Temperatur konstant hielt, andererseits durch Schütteln die Muskelstücke im Puffermedium bewegte, sodaß eine bessere Perfusion gewährleistet war. Nach 120, bzw. 90 Minuten wurden die Gewebsstücke entnommen und die Bestimmungen der Metaboliten im Puffer sofort vorgenommen.

### Auswertung der Ergebnisse

Zunächst wurden die Absolutwerte der Glucoseaufnahme (in mg/gr. Gewebe/ Stunde), der NFS-Spiegel (in  $\mu$ mol/ gr. Gewebe/ Stunde) und der Glycerinproduktion (in  $\mu$ mol/ gr. Gewebe/ Stunde) als Differenz Inkubationsmedium - Leerpuffer errechnet. Bei den NFS wurde der Ausdruck "NFS-Spiegel" verwendet, da es sich teils um eine Freisetzung aus dem Gewebe, teils um eine Verminderung im Medium handelte.

Aus den errechneten Ergebnissen wurden Mittelwert  $\bar{x}$ , Standardabweichung  $s$  und die Anzahl der Messungen  $n$  ermittelt. Diejenigen Ergebnisse, die jenseits des  $2s$ -Bereiches lagen, wurden nicht mitberücksichtigt.

Nachdem aus den Mittelwerten der Absolutwerte kaum signifikante Veränderungen zu errechnen waren, da die Bedingungen und damit die Werte bei den einzelnen Versuchen doch unterschiedlich waren, wurden für jeden einzelnen Versuch die prozentualen Veränderungen zweier Ansätze errechnet, die verglichen werden sollten. Von diesen Veränderungen sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Anzahl der Vergleiche in den Tabellen aufgeführt. Diejenigen Veränderungen, die jenseits des  $2s$ -Bereiches liegen, sind nicht berücksichtigt. Mit 100 % wurden dabei jeweils die Ansätze bezeichnet, gegenüber denen eine Veränderung festgestellt werden sollte. Die Signifikanzen  $p$  beziehen sich mit Ausnahme der Tab. 49 nur auf die prozentualen Veränderungen. Sie wurden mit Hilfe des  $t$ -Testes ermittelt. Dabei wurde die Student Verteilung zugrunde gelegt (10).

Die unterschiedlichen  $n$ -Zahlen in den Tabellen sind dadurch bedingt, daß bei den Absolutwerten und den Prozentwerten die jenseits des  $2s$ -Bereiches liegenden Ergebnisse nicht berücksichtigt wurden.

## II. Ergebnisse.

### 1. Ansätze mit steigender Lactatkonzentration.

Die unter 0 mg% Lactat angegebenen Werte wurden sowohl hier als auch bei allen späteren Versuchen als Kontrollwert betrachtet.

#### a) Glucose-Aufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 1    | 0 mg% | 25 mg% | 50 mg%  |
|-----------|-------|--------|---------|
| $\bar{x}$ | 1,575 | 1,435  | 2,37    |
| s         | 0,870 | 1,035  | 0,84    |
| n         | 9     | 10     | 9       |
| %         | 100   | 96,6   | 169,46  |
| s         | 0     | 65,96  | 82,03   |
| n         | -     | 14     | 12      |
| p         |       | < 0,45 | < 0,005 |

Lactat steigert die Glucoseaufnahme signifikant.

#### b) NFS-Spiegel (µval/gr. Gewebe/Stunde).

| Tab. 2    | 0 mg% | 25 mg% | 50 mg% |
|-----------|-------|--------|--------|
| $\bar{x}$ | 0,203 | 0,659  | 0,4885 |
| s         | 0,626 | 0,7965 | 0,3535 |
| n         | 8     | 11     | 9      |
| %         | 100   | 74,86  | 245,26 |
| s         | 0     | 209,78 | 338,67 |
| n         | -     | 12     | 12     |
| p         |       | < 0,1  | < 0,1  |

#### c) Glykogenneubildung (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 3    | 0 mg%  | 25 mg%  | 50 mg% |
|-----------|--------|---------|--------|
| $\bar{x}$ | 0,059  | 1,6315  | 0,700  |
| s         | 1,2605 | 1,8155  | 0,676  |
| n         | 9      | 8       | 6      |
| %         | 100    | 283,97  | 371,1, |
| s         | 0      | 220,92  | 442,04 |
| n         | -      | 7       | 7      |
| p         |        | < 0,025 | < 0,1  |

Eine Steigerung der Glykogenneubildung durch Lactat ist gering signifikant erkennbar.

Die Ergebnisse der Tab. 1-3 sind in Abb.1 graphisch dargestellt.

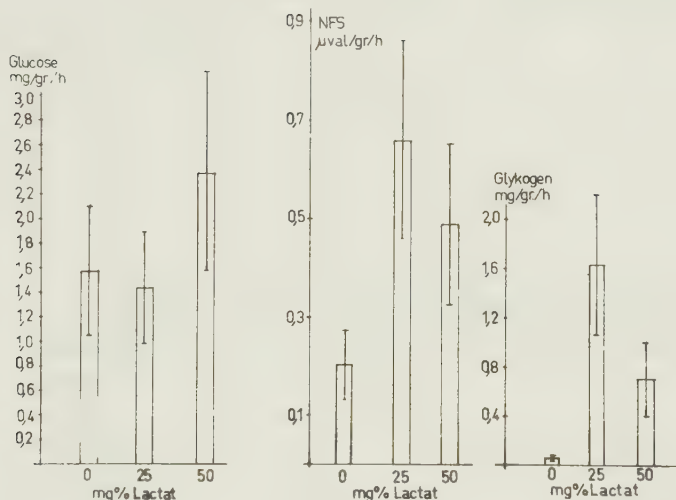


Abb. 1: Graphische Darstellung von Glucoseaufnahme, NFS-Spiegeln und Glykogenneubildung unter steigenden Lactatkonzentrationen. Wiedergegeben sind die Mittelwerte und S.E.M.

## 2. Ansätze mit Buformin und steigenden Lactatkonzentrationen

Es werden Vergleiche gezogen zwischen Buformin- und Kontroll-Ansätzen, zwischen Ansätzen mit Buformin allein und Ansätzen mit Buformin und steigender Lactatkonzentration, sowie zwischen Ansätzen mit Lactat und Ansätzen mit Buformin und Lactat. Bei Ansätzen, in denen Buformin enthalten ist, betrug die Konzentration 1 μg/ml.

### a) Vergleich zwischen Buformin- und Kontrollansätzen.

#### aa) Glucose-Aufnahme (mg/gr. Gewebe/ Stunde)

| Tab. 4    | Kontrollen | Buformin |
|-----------|------------|----------|
| $\bar{x}$ | 1,575      | 1,625    |
| s         | 0,870      | 1,415    |
| n         | 9          | 16       |
| %         | 100        | 121,73   |
| s         | 0          | 81,07    |
| n         | -          | 15       |
| p         |            | < 0,2    |

ab) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/ gr, Gewebe/Stunde)

| Tab. 5    | Kontrolle | Buformin  |
|-----------|-----------|-----------|
| $\bar{x}$ | 0,203     | 0,7425    |
| s         | 0,626     | 1,0535    |
| n         | 8         | 17        |
| %         | 100       | 303,52    |
| s         | 0         | 281,98    |
| n         | -         | 17        |
| p         |           | $< 0,005$ |

ac) Lactatproduktion (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 6    | Kontrolle | Buformin   |
|-----------|-----------|------------|
| $\bar{x}$ | 0,0295    | 0,0526     |
| s         | 1,752     | 1,2595     |
| n         | 10        | 14         |
| %         | 100       | 176,78     |
| s         | 0         | 74,12      |
| n         | -         | 12         |
| p         |           | $< 0,0025$ |

ad) Glykogenneubildung

| Tab. 7    | Kontrolle | Buformin |
|-----------|-----------|----------|
| $\bar{x}$ | 0,059     | 0,9975   |
| s         | 1,2605    | 1,320    |
| n         | 9         | 15       |
| %         | 100       | 307,17   |
| s         | 0         | 860,57   |
| n         | -         | 13       |
| p         |           | $< 0,2$  |

Buformin steigert die NFS-Spiegel signifikant, ebenso die Lactatproduktion.

Die Ergebnisse der Tab. 4 - 7 sind in der Abb. 2 graphisch dargestellt. Widergegeben sind die Mittelwerte und S.E.M.

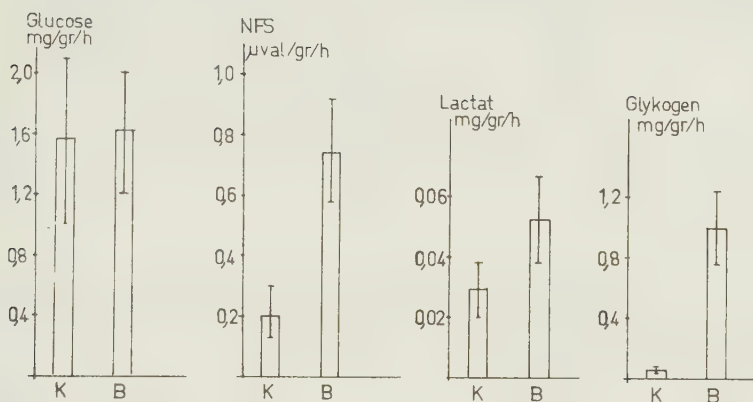


Abb. 2: Graphische Darstellung von Glucoseaufnahme, NFS-Spiegeln, Lactatproduktion und Glykogenneubildung. unter Kontrollen und Buformin.

b) Ansätze mit Buformin und steigender Lactatproduktion

ba) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/ Stunde).

| Tab. 8    | 0 mg% | 25 mg% | 50 mg%   |
|-----------|-------|--------|----------|
| $\bar{x}$ | 1,625 | 1,305  | 2,08     |
| s         | 1,415 | 0,905  | 1,30     |
| n         | 16    | 16     | 20       |
| %         | 100   | 142,0  | 208,25   |
| s         | 0     | 156,3  | 191,66   |
| n         | -     | 18     | 19       |
| p         |       | < 0,15 | < 0,0125 |

bb) NFS-Spiegel (μval/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 9    | 0 mg%  | 25 mg% | 50 mg% |
|-----------|--------|--------|--------|
| $\bar{x}$ | 0,7425 | 0,5595 | 0,626  |
| s         | 1,0535 | 1,2335 | 0,771  |
| n         | 17     | 20     | 19     |
| %         | 100    | 83,95  | 135,32 |
| s         | 0      | 192,38 | 151,14 |
| n         | -      | 15     | 15     |
| p         |        | < 0,4  | < 0,2  |

bc) Glykogenneubildung (mg/ gr. Gewebe/ Stunde)

|           |        |        |        |
|-----------|--------|--------|--------|
| Tab. 10   | 0 mg%  | 25 mg% | 50 mg% |
| $\bar{x}$ | 0,9975 | 0,7585 | 0,633  |
| s         | 1,320  | 0,912  | 0,678  |
| n         | 13     | 11     | 13     |
| %         | 100    | 108,28 | 103,18 |
| s         | 0      | 104,80 | 86,56  |
| n         | -      | 12     | 13     |
| p         |        | <0,4   | <0,4   |

Durch Zugabe von Lactat im Medium wird die Glucoseaufnahme signifikant gesteigert. Die NFS-Spiegel und die Glykogenneubildung werden nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse der Tab. 8 -10 sind in Abb. 3 graphisch dargestellt.

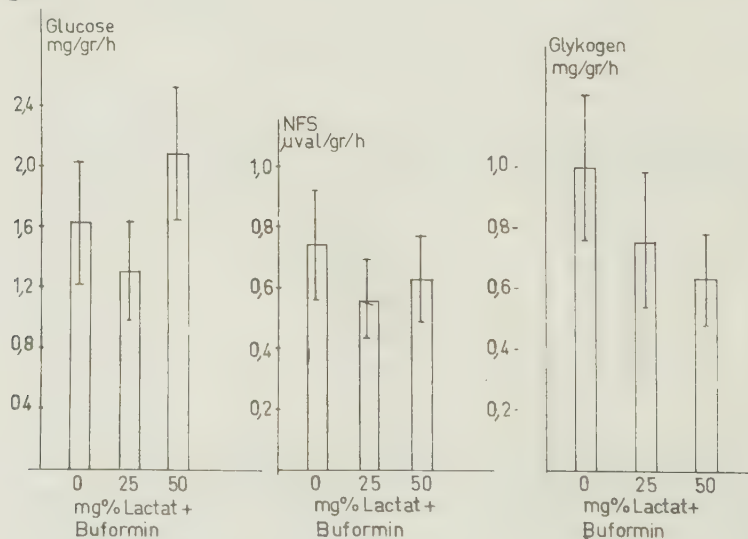


Abb. 3: Graphische Darstellung der Glucoseaufnahme, der NFS-Spiegel und der Glykogenneubildung unter Buformin und steigender Lactatkonzentration. Wiedergegeben sind die Mittelwerte und S.E.M.

c) Vergleich zwischen Ansätzen mit Buformin und 50 mg% Lactat und Kontrollansätzen.

Bei diesem Vergleich soll der gemeinsame Effekt von Buformin und Lactat gegenüber Kontrollen gezeigt werden.

ca) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 11   | Kontrolle | Buformin + 50 mg% L. |
|-----------|-----------|----------------------|
| $\bar{x}$ | 1,575     | 2,08                 |
| s         | 0,870     | 1,30                 |
| n         | 9         | 20                   |
| %         | 100       | 146,52               |
| s         | 0         | 131,68               |
| n         | -         | 12                   |
| p         |           | < 0,15               |

cb) NFS-Spiegel (µval/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 12   | Kontrolle | Buformin + 50 mg% L. |
|-----------|-----------|----------------------|
| $\bar{x}$ | 0,203     | 0,626                |
| s         | 0,626     | 0,771                |
| n         | 8         | 19                   |
| %         | 100       | 576,96               |
| s         | 0         | 1304,11              |
| n         | -         | 13                   |
| p         |           | < 0,1                |

Die signifikante Steigerung der Glucose-Aufnahme durch Lactat (s. Tab. 1) und die signifikante Steigerung der NFS-Spiegel durch Buformin (s. Tab. 5) sind in Anwesenheit von Buformin und Lactat nicht mehr nachweisbar.

d) Vergleich zwischen Ansätzen mit Buformin und Lactat und Lactatansätzen.

Aus diesen Berechnungen soll gefunden werden, ob Buformin in Anwesenheit von Lactat seine Wirkung auf die Glukoseaufnahme und die NFS-Spiegel ändert.

da) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 13   | 25 mg% Lactat | 25 mg% Lactat + Buformin |
|-----------|---------------|--------------------------|
| $\bar{x}$ | 1,435         | 1,305                    |
| s         | 1,035         | 0,905                    |
| n         | 10            | 16                       |

| Tab. 13 | 25 mg% Lactat | 25 mg% Lactat + Buformin |
|---------|---------------|--------------------------|
| %       | 100           | 106,1                    |
| s       | 0             | 79,05                    |
| n       | -             | 19                       |
| p       |               | < 0,4                    |

db) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 14   | 25 mg% Lactat | 25 mg% Lactat + Buformin |
|-----------|---------------|--------------------------|
| $\bar{x}$ | 0,659         | 0,5595                   |
| s         | 0,7965        | 1,2335                   |
| n         | 11            | 20                       |
| %         | 100           | 55,70                    |
| s         | 0             | 166,16                   |
| n         | -             | 20                       |
| p         |               | < 0,05                   |

Buformin vermindert in Anwesenheit von 25 mg% Lactat die NFS-Spiegel signifikant, die Glucoseaufnahme bleibt gleich.

dc) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 15   | 50 mg% Lactat | 50 mg% Lactat + Buformin |
|-----------|---------------|--------------------------|
| $\bar{x}$ | 2,37          | 2,08                     |
| s         | 0,84          | 1,30                     |
| n         | 9             | 19                       |
| %         | 100           | 86,70                    |
| s         | 0             | 51,70                    |
| n         | -             | 21                       |
| p         |               | < 0,15                   |

dd) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/ gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 16   | 50 mg% Lactat | 50 mg% Lactat + Buformin |
|-----------|---------------|--------------------------|
| $\bar{x}$ | 0,4885        | 0,626                    |
| s         | 0,3535        | 0,771                    |
| n         | 9             | 19                       |
| %         | 100           | 144,96                   |
| s         | 0             | 130,14                   |
| n         | -             | 18                       |
| p         |               | < 0,1                    |

Bei einer Lactatkonzentration von 50 mg% bleiben die Glucoseaufnahme und die NFS-Spiegel unter dem Einfluß von Buformin unverändert.

Die Ergebnisse der Tab. 13 und 14 sind zusammen mit dem Ergebnis aus Tab. 4 in Abb. 4, die Ergebnisse der Tab. 5, 15 und 16 in Abb. 5 graphisch dargestellt.

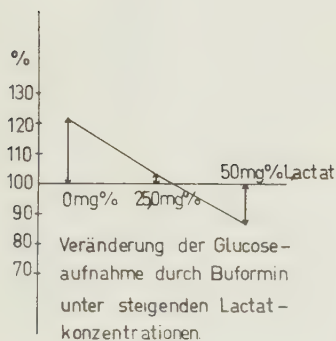


Abb. 4

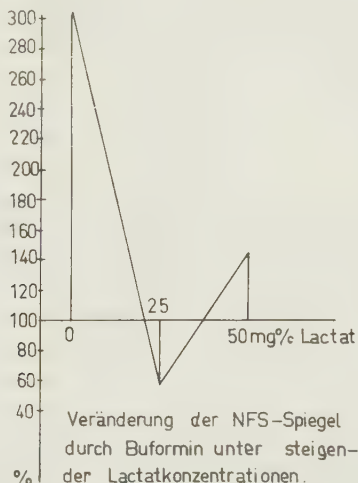


Abb. 5

### 3. Ansätze mit Insulin und steigender Lactatkonzentrationen.

Es werden Vergleiche angestellt zwischen Ansätzen mit Insulin und Ansätzen der Kontrollreihe, sowie zwischen Insulinansätzen und solchen mit Insulin und Lactat, außerdem zwischen Ansätzen mit Insulin und Lactat und Lactatansätzen.

Die Konzentration an Insulin betrug 400  $\mu$ E/ml.

#### a) Vergleich zwischen Insulin und Kontrollansätzen.

##### aa) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde).

| Tab. 17   | Kontrollen | Insulin |
|-----------|------------|---------|
| $\bar{x}$ | 1,575      | 2,45    |
| s         | 0,870      | 1,37    |
| n         | 9          | 9       |
| %         | 100        | 211,33  |
| s         | 0          | 185,32  |
| n         | -          | 9       |
| p         |            | < 0,05  |

ab) NFS-Spiegel (µval/gr. Gewebe/ Stunde)

| Tab. 18   | Kontrollen | Insulin |
|-----------|------------|---------|
| $\bar{x}$ | 0,203      | 0,860   |
| s         | 0,626      | 0,8865  |
| n         | 8          | 10      |
| %         | 100        | 302,23  |
| s         | 0          | 377,19  |
| n         | -          | 10      |
| p         |            | < 0,05  |

ac) Lactatproduktion

| Tab. 19 | Kontrollen | Insulin |
|---------|------------|---------|
| %       | 100        | 123,66  |
| s       | 0          | 172,85  |
| n       | -          | 6       |
| p       |            | < 0,4   |

ad) Glykogenneubildung (ng/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 20   | Kontrollen | Insulin |
|-----------|------------|---------|
| $\bar{x}$ | 0,059      | 0,2875  |
| s         | 1,2605     | 1,1735  |
| n         | 9          | 6       |
| %         | 100        | 196,16  |
| s         | 0          | 951,58  |
| n         | -          | 7       |
| p         |            | < 0,4   |

Insulin stimuliert die Glukoseaufnahme signifikant, ebenso die NFS-Spiegel. Die Lactatproduktion ist nicht vermehrt, die Glykogenneubildung bleibt unverändert.

Die Ergebnisse der Tab. 17,18 und 20 sind in Abb. 6 graphisch dargestellt.

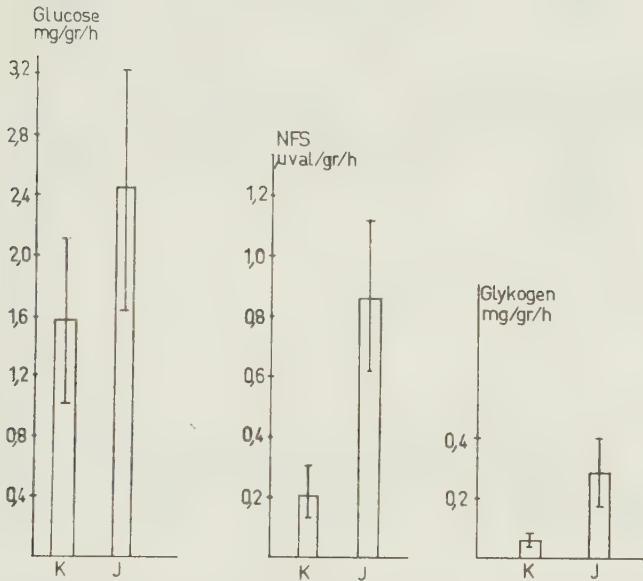


Abb. 6: Graphische Darstellung der Glucoseaufnahme, der NFS-Spiegel und der Glykogenneubildung unter Kontrollen und Insulin mit den Mittelwerten und S.E.M.

b) Ansätze mit Insulin und steigender Lactatkonzentration.

ba) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 21   | 0 mg% | 25 mg% | 50 mg% |
|-----------|-------|--------|--------|
| $\bar{x}$ | 2,45  | 1,735  | 2,61   |
| s         | 1,37  | 0,965  | 1,84   |
| n         | 9     | 11     | 11     |
| %         | 100   | 76,16  | 92,15  |
| s         | 0     | 50,33  | 64,48  |
| n         | -     | 12     | 12     |
| p         |       | < 0,1  | < 0,35 |

bb) NFS-Spiegel (μval/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 22   | 0 mg%  | 25 mg% | 50 mg% |
|-----------|--------|--------|--------|
| $\bar{x}$ | 0,860  | 1,0705 | 0,2566 |
| s         | 0,8865 | 1,2295 | 1,0317 |
| n         | 10     | 12     | 9      |
| %         | 100    | 91,52  | 27,63  |
| s         | 0      | 126,63 | 113,18 |

|         |       |        |        |
|---------|-------|--------|--------|
| Tab. 22 | 0 mg% | 25 mg% | 50 mg% |
| n       | -     | 10     | 10     |
| p       |       | < 0,45 | < 0,05 |

bc) Glykogenneubildung (mg/ gr. Gewebe/Stunde)

|           |        |        |        |
|-----------|--------|--------|--------|
| Tab. 23   | 0 mg%  | 25 mg% | 50 mg% |
| $\bar{x}$ | 0,2875 | 0,437  | 0,909  |
| s         | 1,1735 | 0,678  | 1,290  |
| n         | 6      | 5      | 6      |
| %         | 100    | 128,36 | 375,53 |
| s         | 0      | 80,21  | 337,02 |
| n         | -      | 5      | 6      |
| p         |        | 0,25   | < 0,05 |

Lactat vermindert in Anwesenheit von Insulin die NFS-Spiegel signifikant und steigert die Glykogenneubildung. Die Glucoseaufnahme bleibt unverändert.

Die Ergebnisse der Tab. 21-23 sind in Abb. 7 graphisch dargestellt.

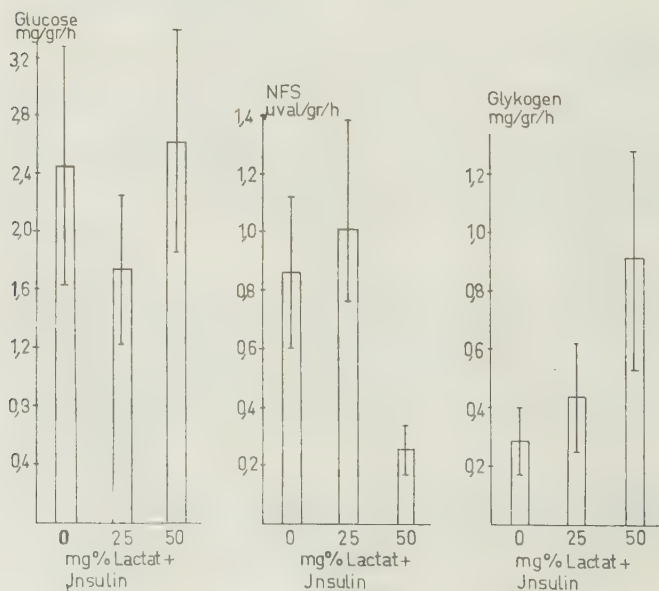


Abb.7: Graphische Darstellung der Glucoseaufnahme, der NFS-Spiegel und der Glykogenneubildung unter Insulin und steigenden Lactatkonzentrationen (Mittelwerte und S.E.M.)

c) Vergleich von Ansätzen mit Insulin und Lactat mit Lactat-Ansätzen.

Hier soll gezeigt werden, welche Wirkung Insulin in Anwesenheit von Lactat hat.

ca) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 24   | 25 mg% Lactat | 25 mg% Lactat + Insulin |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 1,435         | 1,735                   |
| s         | 1,035         | 0,965                   |
| n         | 10            | 11                      |
| %         | 100           | 150,67                  |
| s         | 0             | 75,35                   |
| n         | -             | 10                      |
| p         |               | < 0,025                 |

cb) NFS-Spiegel (µval/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 25   | 25 mg% Lactat | 25 mg% Lactat + Insulin |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 0,659         | 1,0705                  |
| s         | 0,7965        | 1,2295                  |
| n         | 11            | 12                      |
| %         | 100           | 98,16                   |
| s         | 0             | 103,00                  |
| n         | -             | 11                      |
| p         |               | < 0,4875                |

Insulin läßt in Anwesenheit von 25 mg% Lactat die Glucoseaufnahme signifikant ansteigen, die NFS-Spiegel bleiben unverändert.

cc) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 26   | 50 mg% Lactat | 50 mg% Lactat + Insulin |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 2,37          | 2,61                    |
| s         | 0,84          | 1,84                    |
| n         | 9             | 11                      |
| %         | 100           | 106,35                  |
| s         | 0             | 81,27                   |
| n         | -             | 11                      |
| p         |               | < 0,45                  |

In Anwesenheit von 50 mg% Lactat wird die Glucoseaufnahme durch Insulin nicht verändert.

cd) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 27   | 50 mg% Lactat | 50 mg% Lactat + Insulin |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 0,4885        | 0,2566                  |
| s         | 0,3535        | 1,0317                  |
| n         | 9             | 9                       |
| %         | 100           | 16,33                   |
| s         | 0             | 243,96                  |
| n         | -             | 10                      |
| p         |               | < 0,15                  |

Die NFS-Spiegel werden durch Insulin in Anwesenheit von Lactat ebenfalls nicht verändert.

Die Ergebnisse der Tab. 17, 24 und 26 sind in Abb. 8, die Ergebnisse der Tab. 18, 25 und 27 in Abb. 9 graphisch dargestellt.

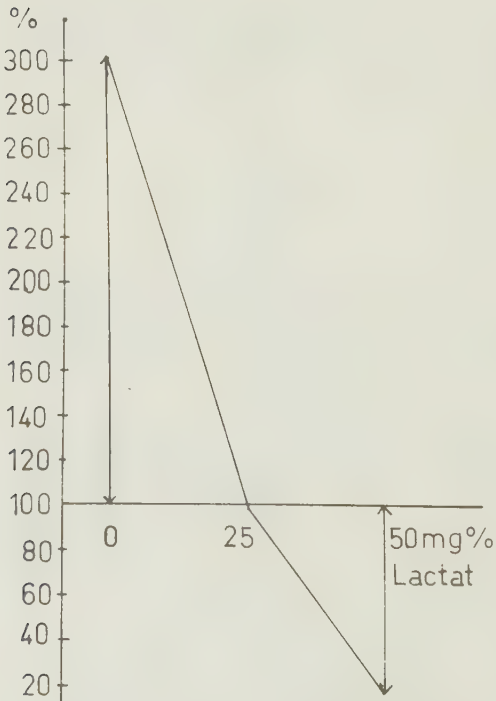
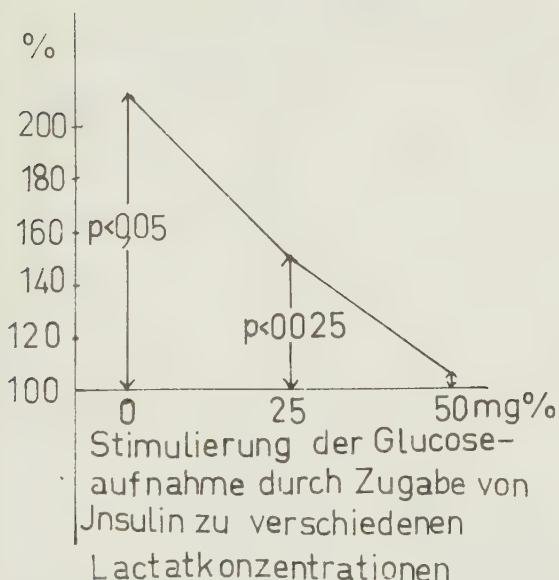


Abb. 9

Veränderung der NFS-Spiegel durch Zugabe von Insulin zu verschiedenen Lactatkonzentrationen.

Abb. 8:



#### 4. Ansätze mit Insulin, Buformin und Lactat.

Hier werden vergleichende Untersuchungen dargestellt zwischen Ansätzen mit Buformin und Insulin und Ansätzen der Kontrollreihe, sowie zwischen Ansätzen mit Buformin und Insulin und solchen mit Lactat, außerdem zwischen Ansätzen mit Buformin, Insulin und Lactat und Lactatansätzen.

Die Konzentration an Buformin betrug  $1 \mu\text{g/ml}$ ,  
die Insulinkonzentration  $400 \mu\text{E/ml}$ .

#### a) Vergleich zwischen Kontrollen und Buformin+Insulin-Ansätzen.

##### aa) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 28   | Kontrollen | Buformin + Insulin |
|-----------|------------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 1,575      | 2,98               |
| s         | 0,870      | 1,645              |
| n         | 9          | 11                 |
| %         | 100        | 196,5              |
| s         | 0          | 89,16              |
| n         | -          | 12                 |
| p         |            | $< 0,0005$         |

ab) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 29   | Kontrollen | Buformin + Insulin |
|-----------|------------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 0,203      | 0,4565             |
| s         | 0,626      | 0,927              |
| n         | 8          | 11                 |
| %         | 100        | 236,06             |
| s         | 0          | 383,95             |
| n         | -          | 11                 |
| p         |            | < 0,15             |

ac) Lactatproduktion

| Tab. 30 | Kontrollen | Buformin + Insulin |
|---------|------------|--------------------|
| %       | 100        | 89,07              |
| s       | 0          | 58,87              |
| n       | -          | 6                  |
| p       |            | < 0,35             |

ad) Glykogenneubildung (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 31   | Kontrollen | Buformin + Insulin |
|-----------|------------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 0,059      | 0,5795             |
| s         | 1,2605     | 1,316              |
| n         | -          | 6                  |
| %         | 100        | 288,16             |
| s         | 0          | 1124,06            |
| n         | -          | 7                  |
| p         |            | < 0,35             |

Durch Buformin und Insulin wird nur die Glucoseaufnahme signifikant gesteigert. Graphische Darstellung in Abb. 10

b) Vergleich von Ansätzen mit Buformin und Insulin und steigender Lactatkonzentration.

ba) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 32   | 0 mg% | 25 mg%   | 50 mg%   |
|-----------|-------|----------|----------|
| $\bar{x}$ | 2,98  | 1,735    | 2,205    |
| s         | 1,645 | 1,09     | 1,775    |
| n         | 11    | 11       | 15       |
| %         | 100   | 69,28    | 55,26    |
| s         | 0     | 32,74    | 35,10    |
| n         | -     | 15       | 14       |
| p         |       | < 0,0025 | < 0,0005 |

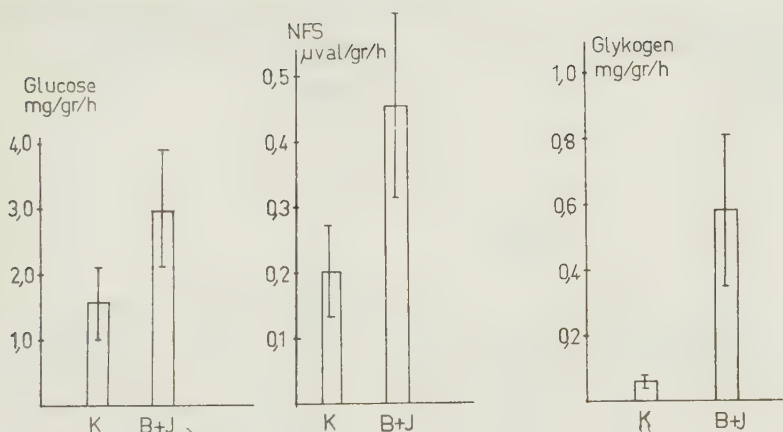


Abb. 10: Graphische Darstellung der Glucoseaufnahme, der NFS-Spiegel und der Glykogenneubildung unter Kontrollen (=K) und unter Buformin und Insulin (+B+I). Wiedergegeben sind die Mittelwerte und S.E.M.

**bb) NFS-Spiegel** ( $\mu\text{val/gr. Gewebe/Stunde}$ ).

|           |        |        |        |
|-----------|--------|--------|--------|
| Tab. 33   | 0 mg%  | 25 mg% | 50 mg% |
| $\bar{x}$ | 0,4565 | 0,345  | 0,8175 |
| s         | 0,927  | 0,5145 | 0,8335 |
| n         | 11     | 14     | 14     |
| %         | 100    | 49,7   | 59,48  |
| s         | 0      | 141,42 | 80,62  |
| n         | -      | 10     | 9      |
| p         |        | < 0,15 | < 0,1  |

**bc) Glykogenneubildung** (mg/gr. Gewebe/Stunde)

|           |        |        |        |
|-----------|--------|--------|--------|
| Tab. 34   | 0 mg%  | 25 mg% | 50 mg% |
| $\bar{x}$ | 0,5795 | 0,2385 | 0,516  |
| s         | 1,316  | 1,213  | 1,3635 |
| n         | 6      | 7      | 7      |
| %         | 100    | 104,16 | 117,8  |
| s         | 0      | 60,80  | 52,31  |
| n         | -      | 5      | 6      |
| p         |        | < 0,45 | < 0,25 |

Die Glucoseaufnahme wird unter Lactat signifikant vermindert, die NFS-Spiegel und die Glykogenneubildung bleiben unverändert.

Die Ergebnisse der Tab. 32,33 und 34 sind in Abb.11 graphisch dargestellt.

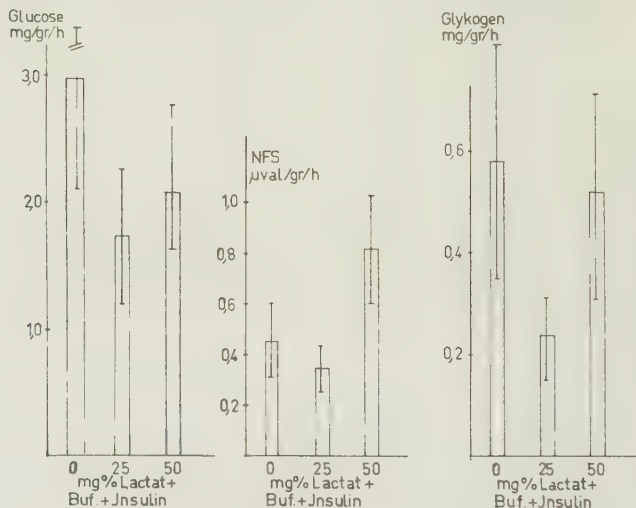


Abb. 11: Graphische Darstellung der Glucoseaufnahme, der NFS-Spiegel und der Glykogenneubildung unter Buformin, Insulin und steigenden Lactatkonzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte und S.E.M.

c) Vergleich zwischen Lactatansätzen und Ansätzen mit Buformin, Insulin und Lactat.

Es soll die Wirkung von Buformin und Insulin in Anwesenheit von Lactat gezeigt werden.

ca) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 35   | 25 mg% Lactat | 25 mg% L. + Buf. + Ins. |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 1,435         | 1,735                   |
| s         | 1,035         | 1,09                    |
| n         | 10            | 11                      |
| %         | 100           | 189,32                  |
| s         | 0             | 144,82                  |
| n         | -             | 13                      |
| p         |               | 0,025                   |

cb) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 36   | 25 mg% Lactat | 25 mg% L. + Buf. + Ins. |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 0,659         | 0,345                   |
| s         | 0,7965        | 0,5145                  |
| n         | 11            | 14                      |
| %         | 100           | 62,94                   |
| s         | 0             | 57,05                   |
| n         | -             | 12                      |
| p         |               | < 0,025                 |

In Anwesenheit von 25 mg% Lactat wird die Glucoseaufnahme durch Buformin und Insulin signifikant vermehrt und die NFS-Spiegel werden signifikant vermindert.

cc) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 37   | 50 mg% Lactat | 50 mg% L. + Buf. + Ins. |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 2,37          | 2,205                   |
| s         | 0,84          | 1,775                   |
| n         | 9             | 15                      |
| %         | 100           | 82,49                   |
| s         | 0             | 70,02                   |
| n         | -             | 14                      |
| p         |               | < 0,2                   |

cd) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 38   | 50 mg% Lactat | 50 mg% L. + Buf. + Ins. |
|-----------|---------------|-------------------------|
| $\bar{x}$ | 0,4885        | 0,8175                  |
| s         | 0,3535        | 0,8335                  |
| n         | 9             | 14                      |
| %         | 100           | 148,97                  |
| s         | 0             | 152,07                  |
| n         | -             | 13                      |
| p         |               | < 0,15                  |

In Anwesenheit von 50 mg% Lactat werden die Glucoseaufnahme und die NFS-Spiegel durch Buformin und Insulin nicht signifikant verändert.

Die Ergebnisse der Tab. 28,35 und 37 sind in Abb. 12, die der Tab. 29, 36 und 38 in Abb. 13 graphisch dargestellt.

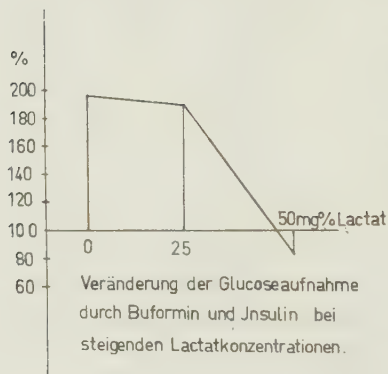


Abb. 12

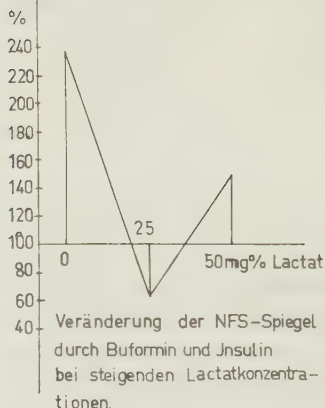


Abb. 13

d) Vergleich von Ansätzen mit Buformin und Ansätzen mit Buformin und Insulin.

Da sowohl Buformin (s. Tab. 5) als auch Insulin (s. Tab. 18) die NFS-Spiegel signifikant erhöhte, soll hier gezeigt werden, welches der beiden stärker auf die NFS-Spiegel wirkt.

da) NFS-Spiegel (μval/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 39   | Buformin | Buformin + Insulin |
|-----------|----------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 0,7425   | 0,4565             |
| s         | 1,0535   | 0,927              |
| n         | 17       | 11                 |
| %         | 100      | 30,79              |
| s         | 0        | 76,36              |
| n         | -        | 14                 |
| p         |          | < 0,0025           |

Durch Zugabe von Insulin zum Puffermedium werden die NFS-Spiegel signifikant weniger. Dies ist, wie auch später noch besprochen werden wird, ein Beweis dafür, daß das Ergebnis aus Tab. 18, nämlich eine verstärkte Lipolyse durch Insulin, nicht als eine Wirkung des Insulins betrachtet werden kann.

# 5. Nachmessungen.

Aus einigen tiefgekühlt aufbewahrten Proben haben wir in Nachmessungen noch das Glycerin bestimmt. Leider sind die Anzahl der Messungen so gering, daß auf eine Signifikanzberechnung verzichtet werden mußte. Die Ergebnisse sind für eine bessere Deutung der Lipolyse des Muskels in der Diskussion herangezogen.

| Tab. 40              | 0 mg% | 25 mg% | 50 mg% |
|----------------------|-------|--------|--------|
| Kontrolle            |       |        |        |
| $\bar{x}$            | 1,01  | 1,29   | ----   |
| n                    | 1     | 1      |        |
| Buformin             |       |        |        |
| $\bar{x}$            | 1,50  | 0,96   | 1,52   |
| n                    | 3     | 4      | 4      |
| Insulin              |       |        |        |
| $\bar{x}$            | 1,00  | 1,96   | 1,45   |
| n                    | 2     | 2      | 2      |
| Buformin<br>+Insulin |       |        |        |
| $\bar{x}$            | 1,05  | 1,14   | 0,94   |
| n                    | 3     | 3      | 3      |

#### 6. Ansätze mit Buformin und Anti-Insulin-Serum.

Da bei den Ansätzen mit Buformin keine signifikante Erhöhung der Glucoseaufnahme zu beobachten war, versuchten wir durch eine neue Anordnung eine mögliche Steigerung der Glucoseaufnahme festzustellen. Dazu wurden die Gewebstückchen vorübergehend mit Anti-Insulin-Serum diabetisch gemacht.

Ein weiterer Anhaltspunkt für diesen Ansatz ist die Tatsache, daß Buformin beim Gesunden den Blutzucker nicht beeinflusst, wohl aber beim Diabetiker. Da Buformin in der Therapie des Diabetes mellitus nur in Anwesenheit von Insulin wirkt, sollte durch diese Versuche ein Effekt gefunden werden, der nur durch Buformin entsteht. Außerdem nahmen wir an, daß sich in den präparierten Stückchen noch körpereigenes Insulin der Versuchstiere befindet. Dieses sollte durch Anti-Insulin-Serum abgebunden werden.

Wir verwendeten Anti-Insulin-Serum der Fa. WELCOME'S RESEARCH, welches auch für die immunologische Insulinbestimmung im Blut verwendet wird. Nach 1:16 Verdünnung gaben wir 0,01 ml dieser Lösung zu 5 ml Inkubationsmedium, das dieselbe Zusammensetzung hatte wie das der vorigen Versuche, also KRB-Puffer mit 200 mg% Glucose.

In Anlehnung an G.FREYTAG (17), der Blutzuckerkurven bei der Maus nach einmaliger Injektion von 0,5 ml Anti-Insulin-Serum vom Meerschweinchen bestimmte, inkubierten wir die Ansätze nur 90 Minuten, da nach 2 Stunden die Wirkung des Anti-Insulin-Serums nicht mehr sicher ist. Nachdem wir bei den ersten Versuchen dieser Art einige unsichere Ergebnisse erhielten, inkubierten wir mit 0,02 ml Anti-Insulin-Serum, worauf die Effekte besser zu sehen waren.

##### a) Vorversuche

Zur Prüfung, ob dieser Ansatz mit Anti-Insulin-Serum auf die Glucoseaufnahme eine Wirkung hat, inkubierten wir zunächst Nebenhodenfettgewebe von Ratten. Zur Stimulierung der Glucoseaufnahme wurden zunächst 400  $\mu$ E/ml Insulin zugegeben. Der eine Ansatz diente als Kontrolle, dem anderen wurden zusätzlich 0,01 ml Anti-Insulin-Serum zugegeben.

Die Glucoseaufnahme betrug beim Kontrollansatz mit Insulin

4,54 mg/gr. Gewebe/Stunde

und beim Vergleichsansatz mit Insulin und Anti-Insulin-Serum

3,085 mg/gr. Gewebe/Stunde

Die NFS-Spiegel beider Proben waren gleich.

Damit hielten wir die Wirksamkeit des Anti-Insulin-Serums für bestätigt.

b) Versuche mit Zwerchfellen.

Zwerchfelle wurden wie bei den vorigen Versuchen inkubiert.

Die Ansätze erhielten, soweit angegeben, 0,02 ml Anti-Insulin-Serum.

ba) Vergleich zwischen Kontrollansätzen und Ansätzen mit Anti-Insulin-Serum.

baa) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 41   | Kontrollen | Anti-Insulin-Serum |
|-----------|------------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 3,203      | 3,265              |
| s         | 1,486      | 3,878              |
| n         | 17         | 12                 |
| %         | 100        | 70,87              |
| s         | 0          | 33,55              |
| n         | -          | 10                 |
| p         |            | < 0,01             |

bab) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 42   | Kontrollen | Anti-Insulin-Serum |
|-----------|------------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 100        | 149,1              |
| s         | 0          | 61,21              |
| n         | -          | 9                  |
| p         |            | < 0,025            |

Es werden deshalb nur Ergebnisse in % angegeben, da die Abso-lutwerte bei den Kontrollen zu unterschiedlich waren, sodaß sich schlecht Mittelwerte errechnen ließen.

bac) Glycerinproduktion ( $\mu$ mol/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 43   | Kontrollen | Anti-Insulin-Serum |
|-----------|------------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 1,1458     | 2,698              |
| s         | 0,2574     | 0,374              |
| n         | 6          | 6                  |
| %         | 100        | 221,23             |
| s         | 0          | 102,74             |
| n         | -          | 6                  |
| p         |            | < 0,0005           |

bad) Glykogenneubildung (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 44   | Kontrollen | Anti-Insulin-Serum |
|-----------|------------|--------------------|
| $\bar{x}$ | 1,4647     | 2,411              |
| s         | 1,5304     | 1,8874             |
| n         | 4          | 3                  |
| %         | 100        | 765,23             |
| s         | 0          | 973,95             |
| n         | -          | 3                  |
| p         |            | < 0,15             |

Durch Anti-Insulin-Serum wird die Glucoseaufnahme der Muskulatur signifikant vermindert, die Lipolyse steigt signifikant an, die Glykogenneubildung bleibt unverändert.

Die Ergebnisse der Tab. 41 - 44 sind in Abb. 14 graphisch dargestellt.

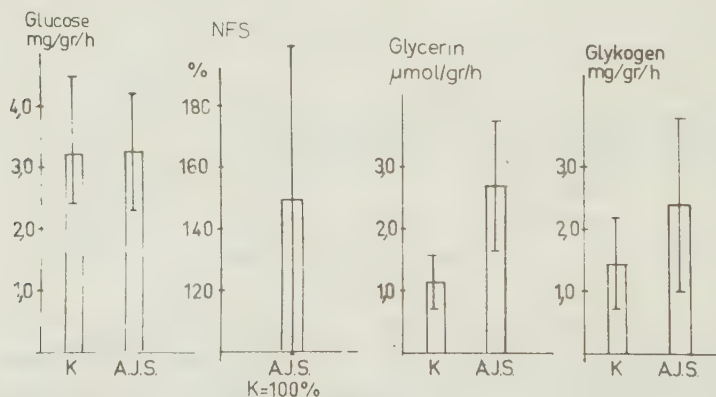


Abb. 14: Graphische Darstellung der Glucoseaufnahme, der NFS-Spiegel, der Glycerinproduktion und der Glykogenneubildung. Bei den NFS-Spiegeln sind die %-Werte mit S.E.M. und bei den übrigen Werten die Mittelwerte mit S.E.M. wiedergegeben.

bb) Vergleich zwischen Ansätzen mit Anti-Insulin-Serum und Ansätzen mit Buformin und Anti-Insulin-Serum.

Hier soll die Wirkung von Buformin in Abwesenheit von Insulin gezeigt werden.

bba) Glucoseaufnahme (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 45   | Anti-Insulin-Serum | Buformin + Anti-Ins.-Serum |
|-----------|--------------------|----------------------------|
| $\bar{x}$ | 3,265              | 2,522                      |
| s         | 3,878              | 1,709                      |
| n         | 11                 | 18                         |
| %         | 100                | 221,9                      |
| s         | 0                  | 151,82                     |
| n         | -                  | 16                         |
| p         |                    | 0,005                      |

bbb) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 46   | Anti-Insulin-Serum | Buformin + Anti-Ins.-Serum |
|-----------|--------------------|----------------------------|
| $\bar{x}$ | 4,117              | 5,297                      |
| s         | 6,847              | 5,771                      |
| n         | 12                 | 22                         |
| %         | 100                | 80,85                      |
| s         | 0                  | 102,39                     |
| n         | -                  | 4                          |
| p         |                    | 0,35                       |

bbc) Glycerinproduktion ( $\mu$ mol/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 47   | Anti-Insulin-Serum | Buformin + Anti-Ins.-Serum |
|-----------|--------------------|----------------------------|
| $\bar{x}$ | 2,698              | 2,148                      |
| s         | 0,374              | 0,360                      |
| n         | 6                  | 8                          |
| %         | 100                | 79,7                       |
| s         | 0                  | 1,13                       |
| n         | -                  | 2                          |
| p         |                    | 0,0005                     |

Die %-Werte wurden aus Mittelwerten errechnet.

bbd) Glykogenneubildung (mg/gr. Gewebe/Stunde)

| Tab. 48   | Anti-Insulin-Serum | Buformin + Anti-Ins.-Serum |
|-----------|--------------------|----------------------------|
| $\bar{x}$ | 2,411              | 1,8327                     |
| s         | 1,8874             | 1,4019                     |
| n         | 3                  | 4                          |
| %         | 100                | 65,43                      |
| s         | 0                  | 16,17                      |
| n         | -                  | 3                          |
| p         |                    | 0,01                       |

In Anwesenheit von Anti-Insulin-Serum, bzw. in Abwesenheit von Insulin, steigert Buformin die Glucoseaufnahme signifikant, ebenso die Glycerinproduktion. Die Glykogenneubildung nimmt signifikant ab.

Die Ergebnisse der Tab. 45 - 48 sind in Abb. 15 graphisch dargestellt.

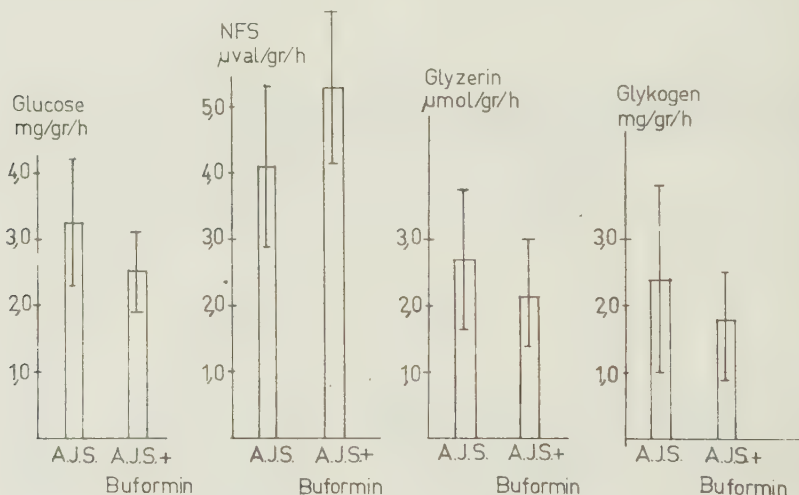


Abb.15: Graphische Darstellung der Glucoseaufnahme, der NFS-Spiegel, der Glycerinproduktion und der Glykogenneubildung unter Anti-Insulin-Serum und unter Buformin mit Anti-Insulin-Serum (=A.I.S.)

## 7. Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Anti-Insulin-Serum und Milchsäure auf Fettgewebe und Muskulatur.

Bei diesen Versuchen ging es darum, zu zeigen, ob die Milchsäure einen dem Insulin ähnlichen Effekt hat. Dazu sollte wiederum das Insulin, das wir noch im Gewebe vermuteten, durch Anti-Insulin-Serum unwirksam gemacht werden. Zu Kontrollansätzen wurde nichts dazugegeben, Vergleichsansätze erhielten 50 mg% Lactat, bzw. 50 mg% Lactat und 0,02 ml Anti-Insulin-Serum. Die Inkubationsdauer betrug 90 Minuten. Da bei diesen Versuchen das Hauptaugenmerk dem Fettstoffwechsel gelten sollte, wurde dem Inkubationsmedium keine Glucose zugegeben. Es bestand also nur aus KRB-Puffer.

a) Untersuchungen am Fettgewebe.

Es wurde gepooltes Nebenhodenfettgewebe von Ratten inkubiert.

aa) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/ gr. Gewebe/ Stunde).

| Tab. 49   | Kontrollen | 50 mg% Lactat | 50 mg% + A.I.S. |
|-----------|------------|---------------|-----------------|
| $\bar{x}$ | 11,071     | 6,875         | 8,720           |
| s         | 4,652      | 3,867         | 8,206           |
| n         | 8          | 8             | 8               |
| p         |            | < 0,05        |                 |
| %         | 100        | 66,06         | 103,02          |
| s         | 0          | 40,31         | 126,03          |
| n         | —          | 8             | 8               |
| %         |            | 100           | 129,07          |
| s         |            | 0             | 264,52          |
| n         |            | —             | 9               |
| p         |            |               | < 0,4           |

Lactat vermindert die NFS-Spiegel sowohl nach Absolutwerten, als auch nach %-Werten signifikant. Durch Zugabe von Anti-Insulin-Serum kehren die verminderte NFS-Spiegel wieder zum Ausgangswert zurück.

ab) Glycerinproduktion ( $\mu$ mol/ gr. Gewebe/ Stunde).

| Tab. 50   | Kontrollen | 50 mg% Lactat | 50 mg% + A.I.S. |
|-----------|------------|---------------|-----------------|
| $\bar{x}$ | 3,011      | 2,132         | 2,618           |
| s         | 1,157      | 0,871         | 1,500           |
| n         | 8          | 8             | 8               |
| %         | 100        | 76,375        | 112,76          |
| s         | 0          | 25,74         | 83,26           |
| n         | —          | 8             | 8               |
| p         |            | < 0,01        | < 0,35          |
| %         |            | 100           | 159,39          |
| s         |            | 0             | 99,13           |
| n         |            | —             | 8               |
| p         |            |               | < 0,05          |

Die Glycerinproduktion wird durch Lactat signifikant vermindert, durch Zugabe von Anti-Insulin-Serum kehrt sie signifikant zum Ausgangswert zurück.

Die Ergebnisse der Tab. 49 und 50 sind in Abb. 16 graphisch dargestellt.

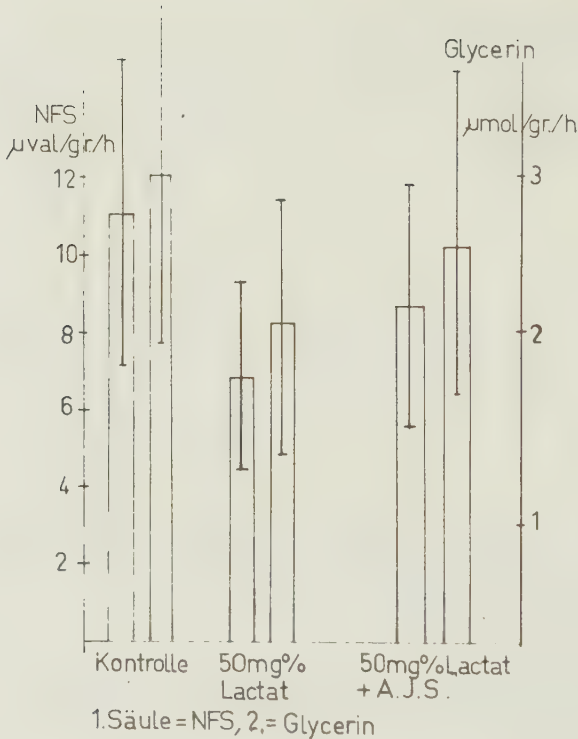


Abb. 16: Graphische Darstellung von NFS-Spiegeln und Glycerinproduktion unter Kontrolle, 50 mg% Lactat und 50 mg% Lactat mit Anti-Insulin-Serum (=A.I.S.). Wiedergegeben sind die Mittelwerte und S.E.M.

#### b) Untersuchungen an der Muskulatur.

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei den unter a) beschriebenen Versuchen am Nebenhodenfettgewebe, nur wurden Zwerchfellhälften inkubiert. Das Medium bestand aus KRB-Puffer ohne Zusatz von Glucose. Kontrollen wurde nichts zugegeben, Vergleichsansätze enthielten 50 mg% Lactat, bzw. 50 mg% Lactat mit 0,02 ml Anti-Insulin-Serum.

ba) NFS-Spiegel ( $\mu$ val/ gr. Gewebe/ Stunde).

| Tab. 51   | Kontrollen | 50 mg% Lactat | 50 mg% + A.I.S. |
|-----------|------------|---------------|-----------------|
| $\bar{x}$ | 5,108      | 0,988         | -0,481          |
| s         | 9,243      | 5,443         | 3,653           |
| n         | 9          | 9             | 9               |
| %         | 100        | 46,81         | 23,84           |
| s         | 0          | 84,69         | 111,37          |
| n         | -          | 8             | 8               |
| p         |            | < 0,05        | < 0,05          |
| %         |            | 100           | 81,14           |
| s         |            | 0             | 63,14           |
| n         |            | -             | 9               |
| p         |            |               | < 0,45          |

Lactat hemmt die NFS-Spiegel an der Muskulatur signifikant, durch Zugabe von Anti-Insulin-Serum werden sie noch geringer, jedoch gegenüber Lactatansätzen nicht signifikant.

bb) Glycerinproduktion ( $\mu$ mol/ gr. Gewebe/ Stunde).

| Tab. 52   | Kontrollen | 50 mg% Lactat | 50 mg% + A.I.S. |
|-----------|------------|---------------|-----------------|
| $\bar{x}$ | 0,366      | -0,092        | 0,318           |
| s         | 1,029      | 1,260         | 1,609           |
| n         | 8          | 9             | 8               |
| %         | 100        | 112,55        | 134,98          |
| s         | 0          | 51,26         | 122,39          |
| n         | -          | 8             | 9               |
| p         |            | < 0,25        | < 0,25          |
| %         |            | 100           | 149,03          |
| s         |            | 0             | 70,19           |
| n         |            | -             | 8               |
| p         |            |               | < 0,05          |

Bei Zugabe von Lactat bleibt die Glycerinproduktion gleich, bei Zugabe von Lactat und Anti-Insulin-Serum steigt sie gering, aber nicht signifikant an, jedoch signifikant gegenüber Lactatansätzen.

Die Ergebnisse der Tab. 51 und 52 sind in Abb. 17 graphisch dargestellt.

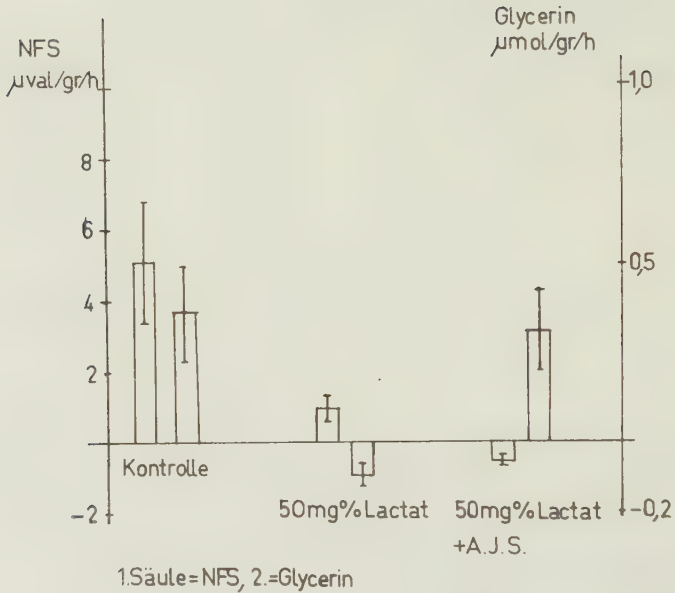


Abb. 17: Graphische Darstellung von NFS-Spiegeln und Glycerinproduktion unter Kontrollen, 50 mg% Lactat und 50 mg% Lactat mit Anti-Insulin-Serum (=A.I.S.). Widergegeben sind die Mittelwerte und S.E.M.

## Diskussion.

Ziel dieser Arbeit war es letzten Endes, einen Beitrag zu leisten zum Wirkungsmechanismus der Biguanide. Obwohl die Biguanide seit einigen Jahren in der Therapie des Diabetes mellitus angewandt werden, ist ihr Wirkungsmechanismus nicht vollends aufgeklärt worden.

Über Guanidin und dessen Abkömmlinge arbeitete bereits 1918 WATANABE. Er fand einen Anstieg des anorganischen Phosphats unter Guanidin (51,52). MINOT fand bei Gabe von Guanidin eine Erhöhung des Blutlactatspiegels (36). Bereits 1921 konnte MEYERHOF eine Hemmung der Muskelatmung demonstrieren (34). HOLLUNGER klärte 1955 den Mechanismus auf: Guanidin hemmt den Elektronentransport auf der Stufe des Cytochrom c (20,55). Als die Biguanide in die Therapie des Diabetes mellitus eingeführt wurden, wurden vielfache Untersuchungen betrieben, um die bereits bekannten Wirkungen mit der blutzuckersenkenden Wirkung in Einklang zu bringen. Die durch die Hemmung der Zellatmung entstehende Anoxie wurde als Grund für eine unspezifische Permeabilitätssteigerung für Glucose angesehen und somit ein Erklärungsversuch für die blutzuckersenkende Wirkung der Biguanide unternommen (40,41). HOLLOBAUGH et al. fanden bei intravenöser Glucosebelastung keine Veränderung der Blutzuckerwerte durch Biguanidgabe, jedoch eine signifikante Veränderung bei oraler Gabe von Glucose (19). Durch Versuche an isolierten Dünndarmschlingen konnten sie eine deutliche Hemmung der Glucoseresorption durch Biguanide zeigen (30).

Am Nebenhodenfettgewebe konnte eine Steigerung der Glucoseaufnahme gezeigt werden (48,14). Außer diesen Befunden an der Ratte konnten SCHÄFER und MEHNERT (43) eine gesteigerte Glucoseoxydation sowohl am Rattenfettgewebe als auch am subkutanen Fettgewebe des Menschen finden. Bei der gesteigerten Glucoseaufnahme findet keine vermehrte Glykogenneubildung statt (49). Die gleiche Biguanidkonzentration, die eine Steigerung der Glucoseaufnahme am Fettgewebe bewirkt, hemmt auch bereits die Wirkung von 1 mE/ml Insulin auf den Einbau von Glucose in Glykogen (45). Die Wirkung von Biguaniden zusammen mit Insulin erscheint dabei widersprüchlich. Während Biguanide die durch kristallisiertes Insulin stimulierte direkte Glucose-Oxydation

hemmen (14,45), fanden DAWEKE und BACH (9) eine Steigerung der Seruminsulinwirkung auf die direkte Glucose-Oxydation. In der Leber bewirken Biguanide eine Verminderung des Glykogengehaltes (46,51) und eine Hemmung der Gluconeogenese (33, 57). Weiterhin findet sich eine vermehrte Lactatproduktion bei in-vitro-Versuchen und eine vermehrte Lactataufnahme durch die Leber bei in-vivo-Versuchen (50).

An der Muskulatur steigern Biguanide die Glucoseaufnahme ebenfalls (47), wobei einmal beobachtet wurde, daß die gesteigerte Aufnahme nur Glucose und nicht Pentosen betrifft (7). DITSCHUNEIT und HOFF (14) konnten die Wirkung von Butylbiguanid in einer Konzentration von  $1,02 \times 10^{-4}$  Mol mit einer Insulinkonzentration von 500  $\mu$ E/ml korrelieren. Der absolute Gehalt an Glykogen wird dabei vermindert (57), die Gluconeogenese gehemmt (33) und die vermehrt aufgenommene Glucose dabei zum überwiegenden Teil als Lactat an das Inkubationsmedium abgegeben (57).

WILLIAMSON et al. (58) machten die Beobachtung, daß am Herzen die aufgenommene Brenztraubensäure mit Biguaniden zu 53 % und ohne Biguanide zu 31 % zu Lactat reduziert wird und der weitere Abbau von Lactat praktisch aufgehoben wird. Den Anstieg der Lactatbildung führten sie zusammen mit der Abnahme der ATP-Konzentration auf eine verstärkte Reduktion des mitochondrialen und des zytoplasmatischen  $NAD^+$ / $NADH$ -potentials zurück. Von UNGAR et al. wurde sogar eine Hemmung aller DPN-abhängigen Reaktionen gefunden. An gesunden Personen untersuchten AREISBERG et al. (29) den Glucose- und Lactatumsatz, die Gluconeogenese aus Lactat und Glucose. Sie fanden dabei einen erhöhten Umsatz von Glucose und Lactat nach Biguanidgabe. M. MILLER (35) berichtet über den Zusammenhang der Biguanidwirkung und der Lactatacidose. Unter therapeutischen Biguanidspiegeln fand er eine Erhöhung des Blutlactatspiegels um 1 meq/ml sowohl bei Gesunden ohne Vorbehandlung als auch bei Probanden mit voreriger exogener oder endogener (durch Infusion großer Mengen Fructose erzeugter) Lactatapplikation. Gegenüber diesen Berichten gibt es nur eine Mitteilung in der Literatur, die eine Erhöhung des Lactats durch Biguanide ablehnt (2).

Da wir aus früheren Versuchen Wirkungen des Lactats am Muskel und am Fettgewebe kannten, nämlich eine Steigerung der Glucoseaufnahme, eine Steigerung der Glykogensynthese und eine Hemmung der Lipolyse, glaubten wir zunächst einen Zusammenhang zwischen der Biguanid- und der Lactatwirkung zu sehen, zumal wir unter Buformin eine gesteigerte Lactatproduktion fanden (Tab. 6, Abb. 2).

In diesen Versuchen wie auch in früheren in diesem Labor (11) war eine Stimulierung der Glucoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell zu finden (Tab. 1, Abb. 1). Lactat stimuliert auch die Glucoseaufnahme in Anwesenheit von Buformin (Tab. 8, Abb. 3), jedoch nicht mehr in Anwesenheit von Insulin (Tab. 21, Abb. 7), da die Wirkung des Insulins auf die Glucoseaufnahme maximal zu sein scheint. Andererseits war durch Zugabe von Insulin zum Puffermedium mit Lactat die Glucoseaufnahme nicht mehr weiter zu stimulieren (Tab. 26, Abb. 8). Es muß also auch dem Lactat eine auf die Glucoseaufnahme stimulierende Wirkung zugeschrieben werden.

Die vermehrt aufgenommene Glucose wird dabei bevorzugt in Glykogen verwandelt (Tab. 3, Abb. 1). Die gesteigerte Glykogensynthese konnten wir bereits in früheren Versuchen beobachten (11). Außerdem waren uns Wirkungen des Lactats auf den Kohlenhydratstoffwechsel aus der Literatur bekannt (1,4,24). Die antilipolytische Wirkung der Milchsäure kannten wir ebenfalls aus früheren Versuchen (12) sowohl am Fettgewebe wie auch an der Muskulatur (11). Wie bei den früheren Versuchen an der Muskulatur (11) fanden wir im glucosereichen Medium keine Hemmung der Lipolyse (Tab. 2, Abb. 1), wohl aber im glucosefreien Medium (Tab. 51, Abb. 17). Die stimulierende Wirkung der Milchsäure auf die Glucoseaufnahme und die Glykogenneubildung scheint dabei stärker zu sein als die Antilipolyse, was im Sinne des Glucose-NFS-Zyklus nach RANDLE (42) zu deuten wäre, wenn man unter Antilipolyse entweder eine vermehrte Aufnahme von NFS in das Gewebe oder eine gesteigerte  $\beta$ -Oxydation der aus dem Gewebe stammenden NFS versteht. Ob es sich bei den verminderten NFS-Spiegeln um eine Antilipolyse, eine gesteigerte Lipogenese oder um eine vermehrte  $\beta$ -Oxydation handelt, kann aus den Werten der Glycerinproduktion erkannt werden. Während wir am Fettgewebe bei verminderten NFS-Spiegeln

auch eine verminderte Glycerinproduktion fanden, zeigte sich an der Muskulatur bei verminderten NEB-Spiegeln keine verminderte Glycerinproduktion (Tab. 52, Abb.17). An der Muskulatur handelt es sich also um eine vermehrte  $\beta$ -Oxydation, wie es auch von anderen Autoren beschrieben wird (11,18,22,23,24, 25,26), während es sich beim Fettgewebe um eine Antilipolyse zu handeln scheint(12).

Vergleicht man nun die Wirkungen von Lactat mit den Wirkungen von Buformin unter dem Aspekt, daß Buformin über die gesteigerte Lactatproduktion wirkt, so muß bei unseren Ergebnissen berücksichtigt werden, daß die durch Buformin bewirkte vermehrte Lactatproduktion nicht die Konzentrationen erreichte, wie sie in den Ansätzen mit Lactat vorlagen. Die Konzentrationen an Lactat bei Buforminansätzen betrugen etwa 10 - 15 mg%, was gut mit den Ergebnissen von MILLER (35) übereinstimmt, der eine Erhöhung um 1meq/l Lactat fand. Die in Tab. 6 beschriebene signifikante Steigerung der Lactatproduktion durch Buformin ist auch aus der Abb. 18 zu ersehen, wo die Korrelationen von Glucoseaufnahme zu Lactatproduktion dargestellt sind.

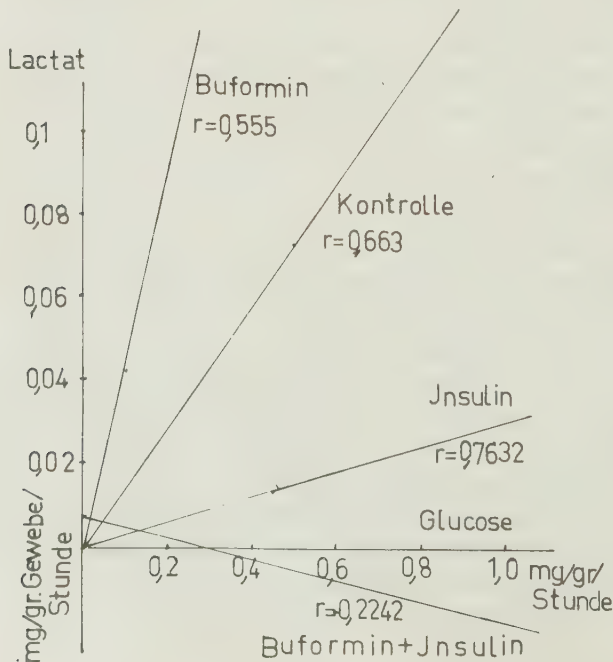


Abb. 18

Abb. 18: Graphische Darstellung der Korrelationsgeraden für die Beziehung zwischen Glucoseaufnahme und Lactatproduktion. Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient und Signifikanz für

Kontrolle:  $y = -0,2839 + 1,5109x$ ;  $r = 0,663$ ;  $p < 0,05$

Buformin:  $y = -0,067 + 0,4941x$ ;  $r = 0,55$ ;  $p < 0,05$

Insulin:  $y = 0,0971 + 0,2959x$ ;  $r = -0,7632$ ;  $p < 0,01$

Ins.+Buf.:  $y = 0,1329 - 0,1771x$ ;  $r = -0,1773$ ; n.s.

Die Glucoseaufnahme wird durch Lactat stärker beeinflusst als durch Buformin (Tab.1, Abb.1 und Tab.4, Abb.2). Die stärkere Wirkung des Lactats kann durch die unterschiedliche Lactatkonzentrationen bei Lactat- und Buforminansätzen erklärt werden, das heißt, daß unter Buformin die Glucoseaufnahme auch deutlich gesteigert wäre, wenn die Lactatproduktion größer wäre. Dafür spricht auch die Stimulierung der Glucoseaufnahme durch Zugabe von Lactat zum Puffermedium mit Buformin (Tab.8, Abb.3). Andererseits wird durch Zugabe von Buformin zum Puffermedium mit Lactat die Glucoseaufnahme nicht gesteigert. Die wesentliche Wirkung auf die Glucoseaufnahme kann also dem Lactat zugeschrieben werden. Ob die gesteigerte Lactatproduktion durch Buformin eine Steigerung der Glucoseaufnahme bewirkt, ist aus diesen Ergebnissen nicht erkennbar. Anders verhält es sich mit der Wirkung auf die Glykogenneubildung. Während Lactat eine deutliche Steigerung der Glykogenneubildung bewirkt (Tab. 3, Abb. 1) (11), scheint Buformin die Glykogenogenese eher zu hemmen. (Tab. 10, Abb. 3, Abb. 19). Aus der Abb. 19, in der die Korrelationen von Glucoseaufnahme zu Glykogenneubildung dargestellt sind, ist erkennbar, daß durch Buformin insbesondere die durch Insulin stimulierte Glykogenneubildung vermindert wird.

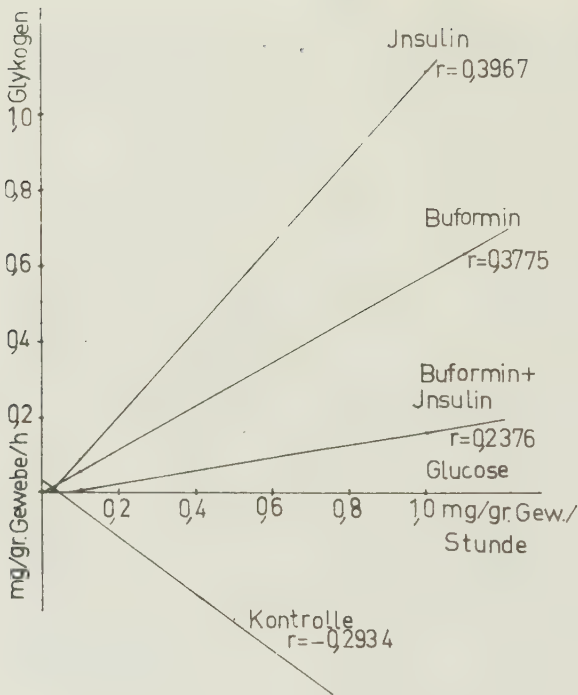
Abb. 19: Graphische Darstellung der Korrelation von Glucoseaufnahme zu Glykogenneubildung. Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient und Signifikanz für

Kontrolle:  $y = 0,3918 - 0,7400x$ ;  $r = -0,2934$ ; n.s.

Buformin:  $y = 0,0412 + 0,5697x$ ;  $r = 0,0304$ ; n.s.

Insulin:  $y = -0,0210 + 0,1138x$ ;  $r = 0,3967$ ; n.s.

Ins.+Buf.:  $y = -0,0744 + 0,1675x$ ;  $r = 0,2376$ ; n.s.



Die verminderte Glykogenneubildung unter Buformin kann aus der bereits bekannten Wirkungsweise des Buformin, nämlich einer Hemmung der Atmungskette auf der Stufe des Cytochrom c, erklärt werden. Die Hemmung des Cytochrom c bedingt eine verminderte Energiebereitstellung für die Muskulatur. Bei der Reduktion von Cytochrom c wird soviel Energie frei wie für die Bildung von 1 ATP benötigt wird.

Betrachtet man den Kohlenhydratstoffwechsel (32) unter dem Gesichtspunkt einer verminderten ATP-Bereitstellung, so kann man die verminderte Glykogenneubildung erklären. Bei der Glykogensynthese aus Glucose werden pro Mol Glucose 3 Mol ATP verbraucht. Bei vermindelter ATP-Bereitstellung, wie wir sie unter Buformin annehmen, scheint besonders die Glykogenneubildung als stark ATP-verbrauchender Vorgang gehemmt zu werden.

Da aber für viele wichtige Stoffwechselvorgänge in der Muskulatur wie Kontraktion und Aufrechterhaltung des Membranpoten-

und Lactat werden die NFS-Spiegel bei steigender Glucoseaufnahme geringer, jedoch nur unwesentlich (Tab. 9, Abb. 3). Deutlicher ist die unterschiedliche Wirkung von Buformin und Lactat bei gleichzeitiger Anwesenheit am Kohlenhydratstoffwechsel zu sehen. Bezüglich der Glykogenneubildung überwiegt die Buforminwirkung und bezüglich der Glucoseaufnahme die Lactatwirkung (Tab. 8, 10, Abb. 3).

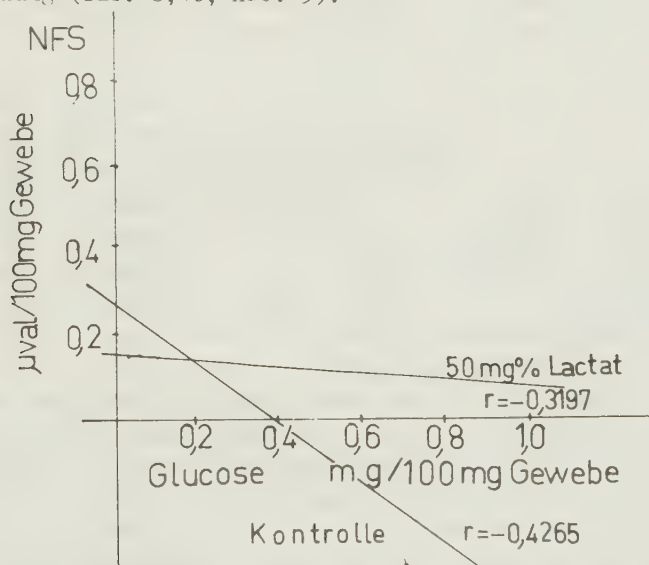


Abb. 20: Graphische Darstellung der Korrelationen von Glucoseaufnahme zu NFS-Spiegeln unter Kontrollen und Lactat. Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen für

Kontrollen:  $y = 0,2681 - 0,6493x$ ;  $r = -0,4265$ ; n.s.

Lactat:  $y = 0,1603 - 0,0935x$ ;  $r = -0,3197$ ; n.s.

Wir können also behaupten, daß der Wirkungsmechanismus des buformin nicht mit der gesteigerten Lactatproduktion und dem Wirkungsmechanismus des Lactats zu erklären ist. Vielmehr handelt es sich bei Buformin um einen gesteigerten Umsatz von Substraten ohne volle Energieausnutzung und beim Lactat um eine Förderung der Energiebereitstellung in Form von energiereichen Phosphaten und um eine Förderung der Energiespeicherung in Form von Glykogen.

tials ATP benötigt wird, muß die Muskulatur auf andere ATP liefernde Stoffwechselwege zurückgreifen. Dabei bietet sich als Ausweg die Glykolyse an, wobei pro Mol Glucose 2 Mol ATP gebildet werden. Eine Stimulierung der Glykolyse durch Buformin kann auch so erklärt werden, daß durch die verminderte ATP-Bereitstellung vermehrt ADP anfällt, welches als Aktivator der Phosphofructokinase gilt. Die Phosphofructokinase ist eine Schlüsselenzym der Glykolyse (32).

Anders verhält es sich bei der Milchsäure: Entsteht Lactat endogen, so wird bei der Umwandlung von Pyruvat zu Lactat 1 Mol NAD frei. Dieses NAD kann für die  $\beta$ -Oxydation der NFS verwendet werden. Die verminderten NFS-Spiegel unter Lactat sowohl am Fettgewebe (Tab. 49, Abb. 16) als auch an der Muskulatur (Tab. 51, Abb. 17) könnten für die vermehrte  $\beta$ -Oxydation sprechen. Wenn aber NAD in der Atmungskette reduziert wird, so werden dabei 12 kcal/Mol frei, die für die Bildung von 1 Mol ATP ausreichen. Dieses ATP könnte dann für die Glykogensynthese verwendet werden.

Am Stoffwechsel der NFS ist unter Buformin eine vermehrte Freisetzung der NFS zu beobachten (Tab. 5, Abb. 2). Bei einer bereits stimulierten Lipolyse, wie wir sie bei den Ansätzen mit Anti-Insulin-Serum sahen (Tab. 42, 43, Abb. 14), steigen durch Zugabe von Buformin die NFS nicht weiter an, dafür fällt die Glycerinproduktion ab (Tab. 46, 47, Abb. 15). Dieses Ergebnis könnte man ebenfalls als Ausdruck für einen gesteigerten Umsatz wie beim Kohlenhydratstoffwechsel unter Buformin deuten. Die verminderte Glycerinproduktion spricht für eine Hemmung der Lipolyse, die NFS-Werte jedoch für eine unvollständige Energieausnützung.

Ein Zusammenhang der Wirkung von Buformin mit der Wirkung von Lactat ist auch am Fettstoffwechsel nicht erkennbar. Gegenüber der vermehrten Lipolyse durch Buformin hatten wir für Lactat eine Verminderung der NFS-Spiegel als Ausdruck einer gesteigerten  $\beta$ -Oxydation gedeutet.

Die Wirkung von Buformin und Lactat auf den Muskelstoffwechsel scheint auch nach Abb. 20 und 21 zunächst die gleiche zu sein. In diesen Abbildungen sind die Korrelationen von Glucoseaufnahme zu NFS-Spiegeln dargestellt. Sowohl unter Lactat als auch unter Buformin bleiben die NFS-Spiegel bei steigender Glucoseaufnahme unverändert. Bei Ansätzen mit Buformin

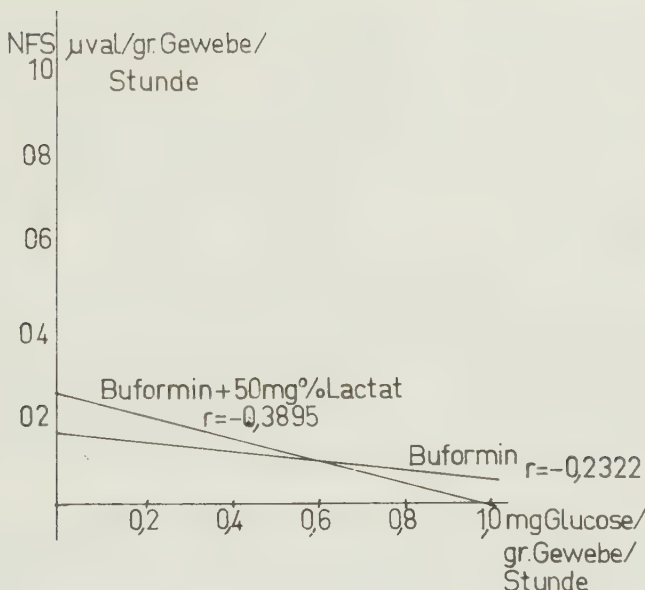


Abb. 21: Graphische Darstellung der Korrelationen von Glucoseaufnahme zu NFS-Spiegeln unter Buformin und unter Buformin + 50 mg% Lactat. Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen für  
 Buformin:  $y = 0,2516 - 0,2004x$ ;  $r = -0,2322$ ; n.s.  
 Buf. + Lactat:  $y = 0,3067 - 0,3167x$ ;  $r = -0,3895$ ; n.s.

Da in der Therapie des Diabetes mellitus Biguanide nur in Anwesenheit von Insulin wirksam sind und andererseits Muskelarbeit die Stoffwechselsituation des Diabetikers wesentlich bessert, wobei wir die Lactatproduktion als Ausdruck der Muskelarbeit betrachten, wollten wir die Wirkungen von Buformin und Lactat mit der Wirkung von Insulin vergleichen. Vor allem wollten wir prüfen, ob Buformin oder Lactat nicht nur eine antidiabetische Wirkung ähnlich dem Insulin haben, oder ob sie eine insulinpotenzierende Wirkung besitzen. Dazu müssen einige Betrachtungen über die Wirkung des Insulins auf den Muskelstoffwechsel vorausgeschickt werden. Insulin steigert die Glucoseaufnahme signifikant. Es fördert sowohl die Glykogenneubildung als auch die Glucoseverwertung zu  $\text{CO}_2$ . Außerdem wirkt es antilipolytisch, bzw. lipogenetisch. (32). Der Abfall der NFS ist eine spezifische Insulinwirkung.

Insulin steigert die Glucoseaufnahme signifikant. Es fördert sowohl die Glykogenneubildung als auch die Glucoseverwertung zu  $\text{CO}_2$ . Außerdem wirkt es antilipolytisch, bzw. lipogenetisch (32). Der Abfall der NFS ist eine spezifische Insulinwirkung.

Bei unseren Untersuchungen über die Insulinwirkung fanden wir folgendes:

Die Glucoseaufnahme wird signifikant stimuliert (Tab. 17, Abb. 6). Die Glykogenneubildung nimmt ebenfalls zu, leider ließ sich keine Signifikanz errechnen (Tab. 20, Abb. 6). Die NFS fanden wir in unseren Versuchen nicht erniedrigt, sondern im Gegenteil signifikant erhöht (Tab. 18, Abb. 6). Die Glycerinproduktion war dabei nicht erhöht (Tab. 40). Die Lactatproduktion ist gegenüber Kontrollen unverändert (Tab. 19).

Bezüglich des Kohlenhydratstoffwechsels fanden wir also Wirkungen, die mit den bekannten Wirkungen des Insulins übereinstimmen. Eine gegenteilige Wirkung zeigte sich am Fettstoffwechsel. Nach Abschluß unserer experimenteller Arbeiten fanden wir in der Literatur eine Erklärung für unsere Beobachtungen: Bei Aufbewahrung von Insulinlösungen in Glasbehältern geht ein Großteil des gelösten Insulins durch Adsorption an die Glaswand verloren (54). In Unkenntnis dieser Tatsache stellten wir einmal eine Verdünnung einer Insulinlösung her, die wir dann bei allen Versuchen verwendeten. Rückblickend konnten wir auch feststellen, daß im Laufe der Zeit die Ergebnisse bei den Ansätzen mit Insulin zunehmend diskordanter zu den bekannten Wirkungen wurden, insbesondere beobachteten wir eine zunehmende Lipolyse. Geringer ausgeprägt waren die Unterschiede am Kohlenhydratstoffwechsel.

Bei der Annahme, daß sich in unserem Inkubationsmedium nicht die gewünschte Konzentration an Insulin ( $400 \mu\text{E/ml}$ ) befand, kann die Versuchsbedingung mit einem Hypoinsulinismus verglichen werden, wie er z.B. beim Altersdiabetiker vorliegt. Hier erlangen dann die Ansätze mit Insulin und Lactat, bzw. Buformin besondere Bedeutung. Diese Substanzen besitzen, wie oben ausgeführt, eine antidiabetische Wirkung. Im folgenden soll nun diese antidiabetische

Wirkung im Zusammenhang mit der Insulinwirkung erläutert werden.

Durch Zugabe von Lactat zum Puffermedium mit Insulin zeigen sich Wirkungen, wie sie vom Insulin allein bekannt sind (32). Die NFS-Spiegel werden signifikant gesenkt (Tab. 22, Abb. 7) und die Glykogenneubildung nimmt signifikant zu (Tab. 23, Abb. 7). Diese Effekte beobachteten wir bereits bei den Ansätzen mit Lactat allein. Die insulinähnliche Wirkung des Lactats konnten wir somit zweimal zeigen.

Weiterhin kann die insulinähnliche Wirkung des Lactats in Abb. 22 gezeigt werden. Dort sind die Korrelationen von Glucoseaufnahme zu NFS-Spiegeln dargestellt. Unter Insulin wären niedrige NFS-Spiegel und eine hohe Glucoseaufnahme zu erwarten. Wie bereits ausgeführt stimmen aber unsere Ergebnisse bei den Insulinansätzen nicht ganz. Deshalb erhielten wir in Abb. 22 auch einen anderen Kurvenverlauf für Insulin, als er nach den bekannten Insulinwirkungen zu erwarten wäre. Dieser erwartete Kurvenverlauf findet sich dann bei der Kurve für Insulin + 50 mg% Lactat: Mit steigender Glucoseaufnahme fallen die NFS-Spiegel ab.

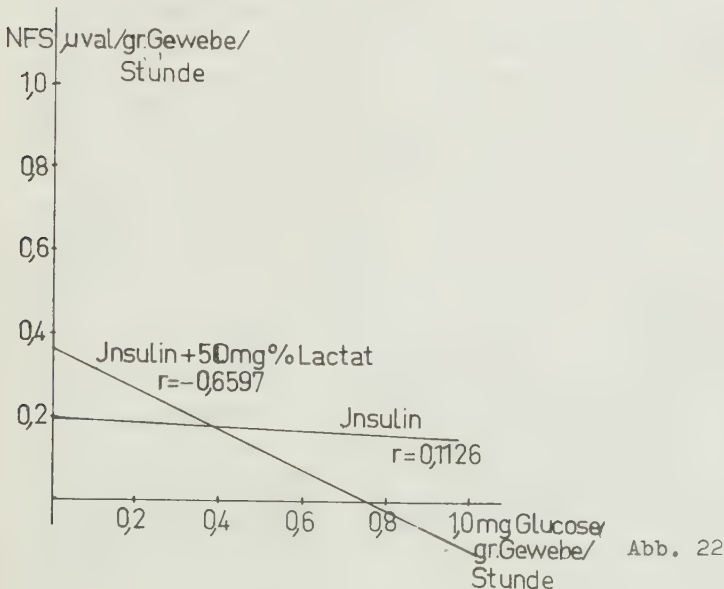


Abb. 22: Graphische Darstellung der Korrelationen von Glucoseaufnahme zu NFS-Spiegeln unter Insulin und Insulin + 50 mg% Lactat. Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizient und Signifikanz für Insulin:  $y = 0,1937 + 0,0409x$ ;  $r = 0,1126$ ; n.s. Insulin + 50 mg% Lactat:  $y = 0,3621 - 0,4819x$ ;  $r = -0,6597$ ;  $p < 0,05$

Wir stellten uns nun die Frage, wodurch die antidiabetische Wirkung bei den Ansätzen mit Insulin und 50 mg% Lactat zustande kommt. Sind es die einzelnen alleinigen Effekte von Insulin und Lactat, die sich addieren, oder wirken beide gemeinsam.

Auf den Kohlenhydratstoffwechsel scheint Lactat stärker zu wirken. Aus Abb. 8 ist zu erkennen, daß durch Zugabe von Insulin zu verschiedenen Lactatkonzentrationen die stimulierende Wirkung des Insulins auf die Glucoseaufnahme mit steigender Lactatkonzentration geringer wird. Die Glucoseaufnahme scheint durch Lactat bereits so stark stimuliert zu sein, daß sie durch Insulin nicht mehr weiter gesteigert werden kann. Anders verhält es sich bei den NFS-Spiegeln. Hier werden die NFS-Spiegel durch Insulinzugabe bei steigenden Lactatkonzentrationen geringer. Dem Insulin ist somit ein Effekt zuzuschreiben, durch den NFS-Spiegel gesenkt werden, was auch aus der Literatur bekannt ist (32).

In Zusatzversuchen wollten wir dann noch den Lactateffekt bei völliger Insulinabwesenheit zeigen. Da wir annehmen, daß sich in den präparierten Gewebstückchen noch körpereigenes Insulin der Versuchstiere befand, haben wir mit Anti-Insulin-Serum im Puffermedium das Insulin abgebunden. Zu solchen Ansätzen haben wir dann Lactat zugegeben und sie mit Ansätzen verglichen, die nur Lactat enthielten. Zunächst inkubierten wir mit dieser Anordnung Fettgewebe wegen der besseren Reproduzierbarkeit und zum Vergleich mit Wirkungen am Muskel. Dabei fand sich ein Abfall der NFS durch Lactat, der durch Anti-Insulin-Serum wieder aufgehoben wurde. Bei der Glycerinproduktion beobachteten wir ebenfalls einen Abfall durch Lactat, der durch Anti-Insulin-Serum wieder aufgehoben wurde (Abb.16, Tab. 49,50).

Wenn wir die lipolytische Wirkung des Anti-Insulin-Serums so interpretieren, daß Insulin eine antilipolytische Wirkung hat (12, 32), die wir auch für Lactat fanden, so können wir behaupten: Am Fettgewebe besitzen Insulin und Lactat eine antilipolytische Wirkung.

Anders verhält es sich bei der Muskulatur, die wir ebenso untersuchten wie das Fettgewebe. Hier fanden wir einen Abfall der NFS, der durch Anti-Insulin-Serum nicht wieder aufgehoben wurde (Tab. 51, Abb.17). Die Glycerinproduktion wurde durch Lactat nicht beeinflusst und durch Anti-Insulin-Serum gesteigert (Tab. 52, Abb.17). Die Lipolyse durch Anti-Insulin-Serum wollen wir als Antilipolyse durch Insulin deuten. An der Muskulatur bewirkt also Insulin eine Antilipolyse und Lactat eine vermehrte  $\beta$ -Oxydation von NFS, wie bereits oben ausgeführt wurde. Dies sind zwei verschiedene Wirkungen, die sich jedoch gut ergänzen können.

Nicht nur Lactat besitzt eine antidiabetische Wirkung nur in Anwesenheit von Insulin, sondern auch Buformin. Deshalb untersuchten wir auch Ansätze mit Insulin und Buformin mit steigender Lactatkonzentration. Die Glucoseaufnahme wird durch Buformin und Insulin signifikant gesteigert (Tab. 28, Abb. 10). Dies scheint ein alleiniger Insulineffekt zu sein, denn durch Buformin allein war die Glucoseaufnahme nicht zu steigern (Tab. 4, Abb. 2), jedoch durch Insulin allein (Tab. 17, Abb. 6). Die Lactatproduktion ist nicht erhöht (Tab. 30) wie bei Buforminansätzen (Tab. 6, Abb. 2). Sie bleibt unverändert wie bei Insulinansätzen (Tab. 19). Aus der Korrelation von Glucoseaufnahme zu Lactatproduktion ist ebenfalls zu ersehen, daß es sich beim Kohlenhydratstoffwechsel unter Buformin und Insulin um einen Insulineffekt handelt. Bei steigender Glucoseaufnahme nimmt die Lactatproduktion weniger zu als unter Buformin. Da die Glykogenneubildung (Tab.31, Abb.10) unverändert bleibt, sogar eher zunimmt, scheint es sich hauptsächlich um den Wirkungsmechanismus des Insulins zu handeln: Glucose wird vermehrt aufgenommen, nur ein kleiner Teil zu Lactat abgebaut, der überwiegende Teil vollständig abgebaut oder in Form von Glykogen gespeichert.

Die NFS-Spiegel sind gegenüber Buforminansätzen signifikant geringer (Tab. 39). Es scheint also die gleiche Wirkung wie bei Zugabe von Lactat zu Insulinansätzen vorzuliegen. Die Insulinwirkung (in diesen Fall die antilipolytische) wird verstärkt, und zwar so, daß die lipolytische Wirkung des Buformin (Tab. 5, Abb. 2) unterdrückt wird.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lactat, Buformin und Insulin ist wohl ein Abfall der Glucoseaufnahme (Tab. 32, Abb. 11) festzustellen, jedoch kein Anstieg der NFS, eher ein leichter Abfall (Tab. 33, Abb. 11). Die Glykogenneubildung bleibt unverändert. Die verminderte Glucoseaufnahme und der leichte Abfall der NFS-Spiegel kann mit dem Glucose-Fettsäuren-Zyklus nach RANDLE (42) erklärt werden. Betrachten wir die Korrelation von Glucoseaufnahme zu NFS-Spiegeln in Abb. 23, so können wir wie bereits vorher die Lactatwirkung zugunsten der NFS sehen: Bei steigender Glucoseaufnahme fallen die NFS-Spiegel ab.

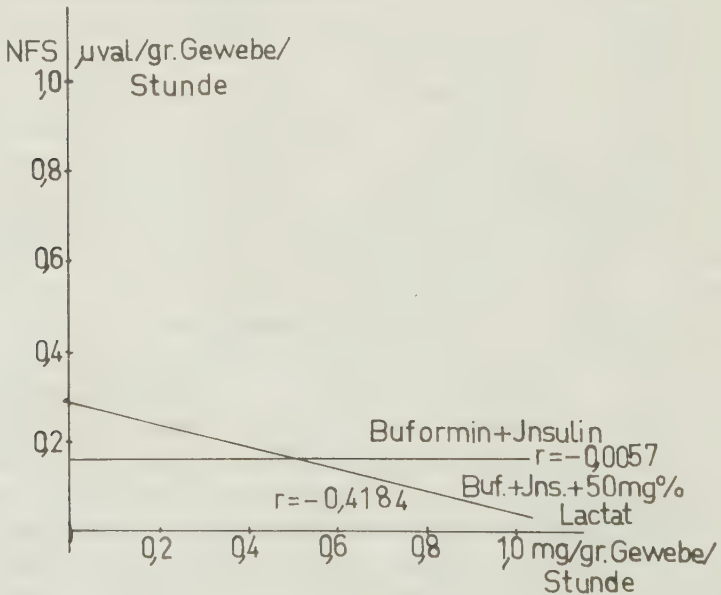


Abb. 23: Korrelation von Glucoseaufnahme in mg/gr. Gewebe/ Stunde zu NFS-Spiegeln unter Buformin und Insulin und unter Buformin, Insulin und Lactat. Regressionsgerade und Signifikanz für

Ins.+Buf.:  $y=0,1670 - 0,0045$ ;  $r=\pm 0,0057$ ; n.s.

Ins.+Buf.+Lactat:  $y=0,2836 - 0,2393$ ;  $r=-0,4184$ ; n.s.

Weitere Aspekte für ein Zusammenwirken von Lactat und Buformin und Insulin ergeben sich aus Untersuchungen über die Physiologie des Insulins im peripheren Gewebe.

Am Fettgewebe wurden Insulinrezeptoren gefunden und quantitativ bestimmt (6). Auch an Leberzellen wurden diese Rezeptoren gefunden (27). Die Stoffwechselvorgänge an diesen Rezeptoren sind allerdings noch unklar. Vorstellbar wäre eine Wirkung des Lactats und des Buformins auf diese Rezeptoren, wie Wirkungen auf die neuromuskulären Synapsen bekannt sind.

Nähere Anhaltspunkte ergeben sich aus Untersuchungen über den Insulinabbau. In dem auch von uns verwendeten Rattenzwerchfell wurde eine für Insulin spezifische Protease, die Insulinase, gefunden (5). Diese wurde auch in anderen Geweben gefunden (38), wobei die Muskulatur weniger enthält als z.B. die Leber. Für die Insulinase wurde auch eine diabetogene Wirkung beschrieben (37). Interessant sind für uns Mitteilungen über Inhibitoren der Insulinase (39, 56).

Unter anderem werden dabei Biguanide und Sulfonylharnstoffe nebst Stoffwechselabfallprodukten beschrieben. In Anbetracht dieser Tatsache, daß die antidiabetische Wirkung von Buformin und Lactat mit der Anwesenheit von Insulin bedingt ist, scheinen diese Erkenntnisse für den Wirkungsmechanismus von Biguaniden von Bedeutung zu sein, wenn auch dem Buformin und dem Lactat, wie oben ausgeführt, sicher eigene Wirkungen zugeschrieben werden müssen.

## Zusammenfassung

Bei in vitro Untersuchungen wurden Rattenzwerchfelle inkubiert und dabei die Wirkungen von Lactat, Buformin und Insulin in alleiniger und gemeinsamer Anwesenheit untersucht. Ein Zusammenhang zwischen der Lactat- und der Buforminwirkung konnte nicht gefunden werden, jedoch eine Unterstützung der Insulinwirkung durch Buformin und Lactat. Gemessen wurden die Glucoseaufnahme, die Lactatproduktion, die Glykogenneubildung, die NFS-Spiegel und die Glycerinproduktion. In ergänzenden Untersuchungen wurde die Lactat- und Buforminwirkung in Abwesenheit von Insulin dargestellt. Die Ergebnisse werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. BÄR, U., M.C. BLANCHAEER: Glycogen and CO<sub>2</sub>-production from glucose and lactate by red and white skeletal muscle.  
Amer. J. Physiol. 209: 905 (1965).
2. BECKMANN, R.: Zum Wirkungsmechanismus der Biguanide.  
Dtsch. med. Wschr. 90, 36, 1589 - 1594 (1965).
3. BELOFF-CHAINE Anne, D.Phil., B.Sc., R. CATANZARO, M.D.,  
and E.B. CHAINE, D.Phil., Ph.D., F.R.S.: Influence of Anti-Insulin-Serum on Glucose Metabolism. I. In Isolated Adipose Tissue.  
Diabetes 16, 472.
4. BENDALL, J.R., A.A. TAYLOR: The Meyerhof quotient and the synthesis of glycogen from lactate in frog and rabbit muscle. A reinvestigation.  
Biochem. J. 118: 887 (1970).
5. BRUSH, J.S.: Purification and characterization of a protease with specificity for insulin from rat muscle.  
Diabetes 20, 3 (1971), 140.
6. CAHILL, G.F.: Physiology of insulin in man.  
Diabetes 20 (1971), No. 12, 785.
7. CLARK, D.W. and N. FORBATH: Some studies on the mode of action of DBI.  
Metabolism 8, 553 (1959).
8. CLARK, D.W. and N. FORBATH: The effects of Phenformin on the isolated rat diaphragm.  
Diabetes 9, 167-169 (1960).
9. DAWEKE, H. and I. BACH: Experimental Studies on the Mode of Action of Biguanides.  
Metabolism 12, 319 (1963).
10. DIEM, K.: Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen.  
7. Auflage, Basel 1968.
11. DIETERLE, P., P. BANHOLZER, R. DIETERLE, J. HENNER and K. SCHWARZ: The Influence of Lactate on Muscle Metabolism.  
Hormone and Metabolic Research 3 (1971), 5, 340.
12. DIETERLEE, P., C. DIETERLE, P. BOTTERMANN et al.: In vitro Versuche zur antilipolytischen Wirkung von

Milchsäure.

Diabetologia, 5, No.4, 238-242 (1969).

13. DIETERLE, P., C. WÜLFERT-HELDTRICH, J. HENNER, K. SCHWARZ:  
Erfahrungen mit einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung der nicht veresterten Fettsäuren im Serum.  
Z. klin. Chem. Biochem. 5:153 (1968).
14. DITSCHUNEIT, H., und F. HOFF: Zum Problem des Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Guanidinderivate.  
New Istanbul Contribution to Clinical Science. 7, 106 (1964).
15. DITSCHUNEIT, H., W. Rott und J.-D. FAULHABER: Effekt von Biguaniden auf den Stoffwechsel isolierter Fettzellen.  
II. Internationales Biguanid-Symposium, Düsseldorf. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967).
16. EGGSTEIN, M., F.H. KREUTZ: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe.  
Klin. Wschr. 44, 5 (1966), 262-273.
17. FREYTAG, G.: Histologische und autoradiographische Untersuchungen am Inselsystem der Maus beim Insulinantikörper-Diabetes.  
Beitr. path. Anat. 137, 121-148 (1968).
18. GOURLEY, D.R.H., K.C. FISHER: The role of lactate in the stimulation of the oxygen consumption of frog muscle by insulin.  
Canad. J. Physiol. Pharm. 42:139 (1964).
19. HOLLOBAUGH, Samuel L., M.D., M. BHASKAR RAO, M.D., and Fred A. KRUGER, M.D.: Studies on the Site and Mechanism of Action of Phenformin.  
I. Evidence for Significant "Nonperipheral" Effects of Phenformin on Glucose Metabolism in Normal Subjects.  
Diabetes, 19, 45 (1970).
20. HOLLUNGER, G.: Guanidines and oxidative phosphorylation.  
Acta Pharmacol. (kbn.) 11, Suppl. 1, 7 (1955).
21. IRSIGLER, K.: Glukoseutilisation und Plasmalipoide bei adipösen Patienten unter dem Einfluß von Dimethylbiguanid (Glucophage)..

- Wiener med. Wschr. 119, 191 (1969).
22. ISSEKUTZ, B., B. PAUL: Intramuscular energy sources in exercising normal and pancreatectomized dogs. Amer. J. Physiol. 215:197 (1968).
23. ISSEKUTZ, B., W.M. BORTZ, H.I. MILLER, A. WROLDSEN: Plasma free fatty acid response to exercise in obese man. Metabolism 16:492 (1967).
24. ISSEKUTZ, B., H.I. MILLER, K. RODAHL: Lipid and carbohydrate metabolism of the exercising dog.
25. ISSEKUTZ, B., H.I. MILLER, P. PAUL, K. RODAHL: Source of fat oxidation in exercising dogs. Amer. J. Physiol. 207:583 (1964).
26. ISSEKUTZ, B., H.I. MILLER: Plasma free fatty acids during exercise and the effect of lactic acid. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 110:237 (1962).
27. KAHN, R., P. FREYCHET, D.M. NEVILLE, Jr., and J. ROTH: Quantitative aspects of insulin interaction with liver membranes. Diabetes 21 (1972), Suppl. 1, p. 334.
28. KEMP, A., A.J.M. KITS VAN HEIJNINGEN: A coloric micromethod for the determination of glycogen in tissues. Biochem. J. 56:646 (1954).
29. KREISBERG, R.A., M.D., L.F. PENNINGTON, M.D. and B.R. BÖSHELL, M.D.: Lactate Turnover and Gluconeogenesis in Obesity. Diabetes 19, 64 (1970).
30. KRUGER, Fred A., M.D., Ruth A. ALTSCHULD, Ph.D., Samuel L. HOLLOBAUGH, M.D., and Barbara JEWETT, B.S.: Studies on the Site and Mechanism of Action of Phenformin. II. Phenformin Inhibition of Glucose Transport by Rat Intestine. Diabetes 19, 50 (1970).
31. MANSFORD, K.R.L., M.Sc.: Influence of Anti-Insulin-Serum on Glucose Metabolism. II. In the Perfused Heart. Diabetes 16, 475-477 (1967).
32. MEHNERT, H.: Kohlenhydratstoffwechsel in: SIEGENTHALER, Klinische Pathophysiologie, 2.Auflage, Thieme

Verlag Stuttgart (1972).

33. MEYER, F., M. IPAKTOHI, H. CLAUSER: Specific Inhibition of Glucogenesis by Biguanides.  
Natur, Vol. 213, No. 5072, 203-204 (1967).
34. MEYERHOF, O.: Die Energieumwandlung im Muskel.  
IV. Mitteilung über die Milchsäurebildung in der zerschnittenen Muskulatur.  
Pflügers Arch. ges. Physiol. 188, 114 (1921).
35. MILLER, M.: Side Effects of the Biguanide Therapy and the Problem of Lactic Acidosis.  
2.Internationales Biguanid-Symposium in Düsseldorf. Thieme Verlag Stuttgart (1967).
36. MINOT, A.S.: The mechanism of the hypoglycemia induced by guanidine and carbon tetrachloride poisoning and its relief by calcium modication.  
J. Pharmacol. exp. Ther. 43, 295 (1931).
37. MIRSKY, I.A.: Insulinase, Insulinase-Inhibitors and Diabetes mellitus.  
Rec. Progr. Horm. Res. 13, 429 (1957).
38. MIRSKY, I.A., and R.H. BROH-KAHN: The Inactivation of Insulin by Tissue Extracts.  
I. The Distribution and Properties of Insulin Inactivation Extracts (Insulinase).  
Arch. Biochem. 20,1 (1949).
39. MIRSKY, I.A., and D. DIENGOTT: Effect of "Insulinase-Inhibitor" on Destruction of Insulin by Intact Mouse.  
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 88, 76 (1955).
40. MORGAN, H.E., M.J. HENDERSON, D.M. REGEN and C.R.PARK: Regulation of glucose uptake in heart muscle from normal and alloxan diabetic rats: The effects of insulin, growth hormone, cortisol and anoxia.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 82, 387 (1959).
41. RANDLE, P.J., and G.H. SMITH: Regulation of glucose uptake by muscle.  
I. The effects of insulin, anaerobiosis and cell poisons on the uptake of glucose and release of potassium by isolatee rat diaphragm.  
Biochem. J. 70, 490 (1958).

42. RANDLE, P.J.: The glucose fatty acid cycle. In: On the nature and treatment of diabetes. Excerpta Medica Foundation (1965).
43. SCHÄFER, G., H. MEHNERT: Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Biguaniden auf die Glucoseoxydation am epididymalen Fetthanhang der Ratte und am Fettgewebe des Menschen. Klin. Wschr. 40, 654 (1962).
44. SITZMANN, G.E.: Vergleichende Untersuchungen zur Insulin- und Biguanidwirkung am isolierten Rattenzwerchfell. Inauguraldissertation, München 1969.
45. SÖLING, H.D., R. ZAHLTEN, M. BÖTTCHER and B. WILLMS: Effects of  $\beta$ -N<sub>1</sub>-Phenethylbiguanide (DBI) on the Metabolism of the Isolated Rat Fat Pad. Diabetologia 3, 377 (1967).
46. STEINER, D.F., and R.H. WILLIAMS: The Effect of Biguanide Compounds Upon Respiratory Enzymes. Clin. Res. 6, 55 (1958).
47. STEINER, D.F., and R.H. WILLIAMS: Actions of phenethylbiguanide and related compounds. Diabetes 8, 154-157 (1959).
48. TRANQUADA, R.E., and P.M. BEIGELMANN: The Metabolic Response of Rat Adipose Tissue to DBI. Clin. Res. 8, 248 (1960).
49. TRANQUADA, R.E., and A.S. BENDER: In Vitro Metabolic Studies With DBI on Rat Diaphragm and Adipose Tissue. Clin. Res. 10, 90 (1962).
50. UNGAR, G., S. PSYCHOYOS, and H.A. HALL: Action of phenethylbiguanide, a hypoglycemic agent, on tri-carboxylic acid cycle. Met. 9, 36 (1960).
51. WATANABE, C.K.: Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. I. Influence of injected guanidine hydrochlorid upon blood sugar content. J. Biol. Chem. 33, 253 (1918).

52. WATANABE, C.K.: Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases.  
IV. The change of phosphate and calcium content in serum in guanidine tetany and the relation between the calcium content and sugar in the blood.  
J. biol. Chem. 36, 531 (1918).
53. WEINGES, K.F., and H. WÖRNER: Über den Einfluß von Insulin und Glukagon auf den Glucose-Stoffwechsel des epididymalen Fettanhanges der Ratte in vitro.  
I. Der Einfluß von Insulin und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten der Bestimmung einer insulinähnlichen Aktivität im menschlichen Blut.  
Klin. Wschr. 39, 5 (1961), 238-243.
54. WEISENFELD Shirley, M.D., S. PODOLSKY, M.D., L. GOLDSMITH, M.D., and L. ZIFF, M.D.: Adsorption of Insulin to Infusion Bottles and Tubing.  
Diabetes Vol. 17, No. 12, 766-771.
55. WICK, A.N., E.R. LARSON, and G.S. SERIF: A site of action of phenethylbiguanide, a hypoglycemic compound.  
J. biol. Chem. 233, 296 (1958).
56. WILLIAMS, R.H., F.B. MARTIN, E.D. HENLEY and H.E. SWANSON: Inhibitors of Insulin Degradation.  
Metabolism 8, 99 (1959).
57. WILLIAMS, R.H., J.M. TYBERGHEIN, P.M. HYDE and R.L. NIELSEN: Studies related to the Hypoglycemic Action of Phenethylbiguanide.  
Metabolism 6, 311 (1957).
58. WILLIAMSON, J.R., R.S. WALKER, and A.E. RENOLD: Metabolic Effects of Phenethylbiguanide (DBI) on the Isolated Perfused Rat Heart.  
Metabolism 12, 1141 (1963).

Lebenslauf

Am 10.11.1946 wurde ich in Weilheim, Kreis Weilheim, als zweites Kind meiner Eltern Paul und Maria Wagner, geb. Stangl, geboren. Die Volksschule besuchte ich in Weilheim in den Jahren 1953 bis 1957. Von 1957 bis 1960 besuchte ich das Gymnasium der Benediktiner in Schäftlarn und von 1960 bis 1966 das Gymnasium Weilheim, wo ich die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966/67 studierte ich an der Universität Erlangen und vom Sommersemester 1967 ab an der Universität München. Im Frühjahr 1968 bestand ich das Vorphysikum und im Sommer 1969 das Physikum.

Im Herbst 1972 legte ich das Staatsexamen ab.





